

Aus dem
Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin

DISSERTATION

**Von der Infektion zur Autoimmunität:
Die Bedeutung der Bystander-Aktivierung
von Th-Zellen im Modell der
experimentellen autoimmunen Enzephalitis**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae
(Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätsmedizin Berlin

von
Volker Siffrin
aus Kaiserslautern

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. T. Kamradt, Friedrich-Schiller-Universität Jena
 2. Prof. Dr. R. Lauster, Technische Universität Berlin
 3. Prof. Dr. W. Brück, Georg-August-Universität Göttingen

Datum der Promotion: 25.04.2005

Zusammenfassung

Epidemiologische Daten belegen eine Assoziation von Infektionen mit der Exazerbation von Autoimmunerkrankungen, wobei man aber die Wege, die dahin führen noch nicht voll versteht. Die gängigste Hypothese sieht die Ursache für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen in der Kreuzreaktivität zwischen mikrobiellen und Selbst-Antigenen, die von der selben T-Zelle erkannt werden. Dieser Antigen-spezifische Mechanismus konnte allerdings bisher nicht durch die Forschung belegt werden. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass im Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalitis durch die Aktivierung mit Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien (LPS) Schübe in normalen Mäusen ausgelöst werden können. Diese Art der Behandlung führt in-vitro zur Proliferation und zur Zytokinproduktion bei einem Teil der T-Helfer (Th)-Effektor/Gedächtniszellen. Dabei ist zwar der physische Kontakt zwischen Th-Zellen und CD4⁺-LPS-responsiven Zellen essentiell, jedoch geschieht die Aktivierung nicht über den T-Zellrezeptor. Als entscheidend hat sich die Bindung von kostimulatorischen Rezeptoren auf Th-Zellen durch kostimulatorische Moleküle auf CD4⁺-Zellen erwiesen. Diese Form der Bystander-Aktivierung bietet eine Antigen-unabhängige Erklärung für die Zusammenhänge von Infektion und Autoimmunität, die mit den klinischen und epidemiologischen Daten besser vereinbar ist als die Antigen-spezifischen Modelle.

Schlagworte:

Bystander-Aktivierung, EAE, Infektion, Autoimmunität, LPS, Kostimulatorische Moleküle

Abstract

Infections sometimes associate with exacerbations of autoimmune diseases through pathways that are poorly understood. Antigen-specific mechanisms such as cross-reactivity between a microbial antigen and a self-antigen have received no direct support. Here it is shown that activation by lipopolysaccharide (LPS) induces relapses of experimental autoimmune encephalitis (EAE) in normal mice. This form of treatment induces proliferation and cytokine production in a fraction of effector/memory T helper (Th) lymphocytes in vitro via physical contact of Th cells with CD4⁺-LPS-responsive cells. TCR mediated signals are not necessary; rather what is required is ligation of costimulatory receptors on Th cells by costimulatory molecules on the CD4⁺ cells. This form of bystander activation provides an antigen-independent link between infection and autoimmunity that might fit the clinical and epidemiological data on the connection between infection and autoimmunity better than the antigen-specific models.

Keywords:

bystander-activation, EAE, LPS, autoimmunity, costimulatory molecules, infection

1	VORWORT	9
	Die Multiple Sklerose.....	9
2	EINLEITUNG	10
2.1	Grundlagen des Immunsystems	10
2.1.1	Die Familie der TLR-Rezeptoren als Bestandteil des angeborenen Immunsystems	11
2.1.2	Die Rolle der T-Zellen.....	12
2.1.3	Antigen-präsentierende Zellen.....	14
2.2	Autoimmunkrankheiten.....	18
2.3	Hypothesen zur Entstehung von Autoimmunität	19
2.3.1	Unvollständige Deletion autoreaktiver T-Zellen	19
2.3.2	Molekulare Mimikry	20
2.3.3	Bystander-Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen.....	22
2.4	Die experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) als Tiermodell der MS	23
3	ZIELSETZUNG	26
4	MATERIAL UND METHODEN	27
4.1	Laborartikel	27
4.1.1	Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien	27
4.1.2	FACS-Antikörper und Sekundärfarbstoffe	28
4.1.3	Sonstige Reagenzien und Chemikalien.....	29
4.1.4	Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchsmaterialien.....	30
4.1.5	Geräte.....	30

4.2	Tiermodelle.....	31
4.2.1	Mausstämme PL/J und B10.PL	31
4.2.2	Mausstämme α k.o. und MBPTC α k.o. (T ⁺ α ⁻)	31
4.2.3	Mausstamm DBA/DR2	31
4.2.4	Mausstamm SJL/J	32
4.3	Zellbiologische Methoden.....	32
4.3.1	Zellkultur	32
4.3.2	Zellgewinnung	32
4.3.3	Zellsortierung.....	34
4.3.4	Zellkultur	36
4.3.5	T-Zellrezeptor-Blockade durch Ciclosporin A	36
4.3.6	Gewinnung von Überstand aus LPS-Kulturen.....	36
4.3.7	Verminderung von Kostimulation durch blockierende Antikörper	37
4.4	Durchflusszytometrie.....	37
4.4.1	Prinzip.....	37
4.4.2	Oberflächenfärbung	39
4.4.3	Intrazelluläre Färbung.....	39
4.4.4	Färbung mit CFSE	40
4.5	Experimente an lebenden Tieren.....	41
4.5.1	Das Modell der EAE.....	41
4.5.2	Induktion der EAE	41
4.5.3	Zweitimmunisierung mit LPS.....	42
4.5.4	Aufarbeitung für die Histologie.....	42
5	ERGEBNISSE	44
5.1	LPS löst bei normalen naiven Mäusen keine EAE aus.....	45
5.2	LPS induziert EAE-Schübe bei in Remission befindlichen SJL-Mäusen....	47
5.2.1	Klinischer Verlauf der LPS-induzierten Schübe	47
5.2.2	Histologische Untersuchung der LPS-induzierten Schübe	50

5.3	LPS zeigt eine aktivierende Wirkung auf CD4-positive Zellen.....	52
5.3.1	Proliferation	52
5.3.2	Aktivierungsmarker	53
5.3.3	Zytokinproduktion	55
5.3.4	Bei vorimmunisierten SJL findet man in-vitro mehr LPS-responsive Th- IFN γ -Produzenten.....	56
5.4	Der Mechanismus der LPS-induzierten Bystander-Aktivierung von Th- Zellen	58
5.4.1	LPS wirkt nicht direkt auf CD4 ⁺ -Lymphozyten	58
5.4.2	Th-Zellen aus Lymphknoten und dem ZNS zeigen schwächere Antworten auf LPS	60
5.4.3	LPS-Effekte sind vom direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Th-Zellen und Nicht-Th-Zellen abhängig.....	62
5.4.4	LPS-Effekte sind auch bei T-Zell-Rezeptor-Blockade messbar.....	65
5.4.5	Kostimulation spielt bei der LPS-induzierten Th-Zellaktivierung eine wichtige Rolle	67
6	DISKUSSION.....	70
6.1	LPS-Wirkung bei naiven EAE-suszeptiblen Mäusen.....	70
6.2	LPS-Immunisierung kann EAE-Schübe induzieren	72
6.2.1	Immunstimuli und der Verlauf von EAE.....	73
6.2.2	Abgrenzung der LPS-Schübe vom „Bystander-Schaden“	75
6.3	LPS und die Bystander-Aktivierung von Th-Zellen.....	77
6.3.1	LPS aktiviert Th-Zellen	77
6.3.2	LPS aktiviert zentrale, potentiell enzephalitogene Th-Gedächtniszellen ...	78
6.3.3	LPS aktiviert die Th-Zellen auf indirektem Wege.....	79
6.3.4	Kostimulation als Erklärung für die Th-Zell-Aktivierung.....	81
6.4	Der Einfluss von Infektionen und „Pathogen-assoziierten Pattern“ (PAMP) auf autoimmune Prozesse.....	83

6.5 Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Tiermodell auf den Menschen...	86
Zusammenfassung	3
Abstract.....	4
Abkürzungsverzeichnis	88
Literaturverzeichnis	90
Danksagung	98
Lebenslauf.....	99
Eidesstattliche Erklärung.....	100

1 Vorwort

Die Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist mit weltweit 2,5 Millionen Betroffenen die bedeutendste entzündliche Autoimmunkrankheit des zentralen Nervensystems und stellt in unserer Gesellschaft die häufigste Ursache für neurologische Behinderung bei jungen Erwachsenen dar.

Das Krankheitsbild wird bestimmt von den verschiedensten motorischen, sensiblen und sensorischen Ausfallerscheinungen, die zum Teil reversibel sein können. Die MS zeigt allerdings kein einheitliches Krankheitsbild, sondern man findet ein breites Spektrum was den individuellen Ausprägungsgrad der Symptomatik und den Verlauf angeht.

Das pathologische Bild ist gekennzeichnet durch eine akute fokale entzündlich bedingte Demyelinisierung der Nervenbahnen im zentralen Nervensystem. Dabei sind die Oligodendrozyten, die die isolierende Myelinscheide um die Axone bilden und somit eine schnelle Erregungsleitung erst möglich machen das Hauptziel der Entzündungszellen. Kommt es zu einem Verlust dieser isolierenden Hülle, so kann die Erregungsleitung nur noch langsamer oder gar nicht mehr stattfinden. Darüber hinaus kommt es durch den fehlenden Schutz zur Spontanaktivität der betroffenen Axone und einem pathologischen Ansprechen auf mechanische Reize [Compston, 02].

Die bisherigen Forschungsergebnisse zeigen, dass die Ursachen sowohl in Umweltfaktoren als auch in der genetischen Prädisposition zu suchen sind.

Gerade der genetische Hintergrund der MS ist ein sehr gut untersuchtes Thema und man kann die MS als eine Krankheit mit echter polygener Vererbung ansehen. Das heißt es gibt kein MS-Gen, das bei Vorhandensein einer bestimmten Mutation nach den Mendel-Regeln bei den Nachkommen in einem bestimmten Prozentsatz die Krankheit auslöst, sondern die Grundlage ist das Auftreten von normalen Genpolymorphismen, die man also sowohl bei Kranken als auch Gesunden finden kann [Kurtzke, 93].

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Assoziation von MS und Infektionen beispielhaft an einem Tiermodell. In prospektiven Studien hat man herausgefunden, dass etwa 10 %

banaler meist viraler Infektionen des Gastrointestinal- und oberen Atmungstraktes bei MS-Kranken in Remission von einem Schub gefolgt werden [Buljevac, 02; Sibley, 85]. Zur Erforschung der multiplen Sklerose steht das Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) zur Verfügung, das Gegenstand der Experimente in dieser Arbeit war und der Krankheit beim Menschen nahe kommt.

2 Einleitung

2.1 Grundlagen des Immunsystems

Der Körper befindet sich im ständigen Austausch mit seiner Umwelt. Daher ist es wichtig potentiell schädliche Einflüsse, wie zum Beispiel Bakterien und Viren, von solchen zu unterscheiden, die harmlos sind.

Zu diesem Zweck hat sich im Laufe der Evolution ein spezialisiertes System von Zellen entwickelt, das den Körper vor Infektionen schützen soll. Dieses System wird Immunsystem genannt. Man unterscheidet dabei zwischen der angeborenen und der erworbenen Abwehr. Beide haben dabei festgelegte Aufgaben, die dem Ziel dienen, fremde Organismen innerhalb des Körpers zu erkennen, zu bekämpfen und abzutöten.

Mit der angeborenen Abwehr hat man ursprünglich das primitive und bei Wirbellosen einzige Abwehrsystem bezeichnet, dessen Hauptaufgabe in einer unspezifischen Bekämpfung von Infektionserregern liegt. Diese Abläufe sind zum Großteil stereotyp und keinem Lern- bzw. Gedächtnisprozess unterlegen und laufen auf verschiedene Reize hin immer gleich ab. Beispiele dafür sind die Arbeit der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, die beim Eindringen von Bakterien diese unspezifisch durch Phagozytose aufnehmen und somit unschädlich machen [Alberts, 3. Auflage].

Auf der anderen Seite gibt es die hoch spezialisierten B- und T-Lymphozyten, die ein bestimmtes Antigen erkennen und im Falle der B-Zelle nach Reifung spezifische Antikörper herstellen oder im Falle der T-Zelle zur Organisation des Abwehrprozesses beitragen. Dabei kommt es auch zu einem Lernprozess, der, wie das klassische Beispiel der

Impfung zeigt, zu einer rationalisierten und optimierten Reaktion bei erneutem Kontakt mit der Noxe führt.

Die wissenschaftliche Erkenntnis geht dahin, dass sich die beiden Systeme ergänzen, da gerade in letzter Zeit die Bedeutung der angeborenen Immunität jenseits der Aufgabe der Erste-Hilfe- und Barrierefunktion immer mehr in den Mittelpunkt rückt.

Spätestens mit der Entdeckung der TLR (engl: toll-like receptors, Toll-ähnliche Rezeptoren), einem Typ von Rezeptoren, die speziell Bakterien und Virenpartikel, so genannte PAMP (engl.: pathogen-associated molecular pattern, Pathogen-assoziierte molekulare Muster) erkennen, hat sich die Sicht auf das angeborene Immunsystem geändert. Diese genetisch festgelegten Rezeptoren kommen nämlich auch auf vielen Zellen des adaptiven Systems vor und haben einen modulatorischen Einfluss auf deren Aufgaben im Immunsystem [Janeway, Jr., 02; Takeda, 03].

Diese Verschränkung von angeborenem und adaptivem Immunsystem stellt eine interessante Perspektive für die Erforschung von Fehlregulationen der Feinabstimmung bei der Immunantwort dar. Dies trifft vor allem für den Bereich der Autoimmunität zu, der gekennzeichnet ist durch eine Fehlfunktion des Immunsystems.

2.1.1 Die Familie der TLR-Rezeptoren als Bestandteil des angeborenen Immunsystems

Die Entdeckung der TLR-Rezeptoren geschah über den Umweg der Erforschung des Immunsystems bei den Wirbellosen. Bei diesen Tieren gibt es kein adaptives Immunsystem mit B- und T-Lymphozyten, sondern allein dem angeborenen Immunsystem kommt der wichtige Part der Erkennung von Pathogenen zu.

Bei der Fliege *Drosophila* entdeckte man das für die Entwicklung wichtige Toll-Gen, dessen Homologe auch bei den Säugetieren gefunden werden konnten und die in der Folge als Angehörige der Toll-like-Receptor (TLR)-Familie bezeichnet wurden. Dabei konnte man bei den Säugetieren eine wichtige Funktion der TLR-Familie für die Erkennung von Mikroorganismen anhand der Genexpression inflammatorischer Zytokine und kostimulatorischer Moleküle nachweisen [Takeda, 03].

Die TLR erkennen bestimmte mikrobielle und virale Strukturen, so genannte PAMP wie zum Beispiel Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien (LPS). Dabei scheinen

die unterschiedlichen TLR auch zwischen Infektionen mit unterschiedlichen Pathogenen differenzieren zu können. Man konnte zum Beispiel zeigen, dass LPS, das vor allem bei gramnegativen Infektionen freigesetzt wird, durch TLR-4 nicht aber durch TLR-2 erkannt werden kann. TLR-2 seinerseits bindet Glykopeptide, die bei einer Vielzahl von verschiedenen Infektionen frei werden können.

Die TLR kommen vor allem auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC, engl.: antigen presenting cells) und im Besonderen auf dendritischen Zellen vor. Die Aktivierung der dendritischen Zellen durch Pathogen-assoziierte mikrobielle Muster (PAMP) führte zu einer Maturation, die eine klonale Expansion Antigen-spezifischer T- und B-Zellen ermöglichte. Somit konnte eine klare Verschränkung von angeborener und adaptiver Immunität nachgewiesen werden [Takeda, 03].

2.1.2 Die Rolle der T-Zellen

2.1.2.1 Entstehung und Reifung

Die T-Zelle stellt einen wichtigen Schalt- und Kontrollpunkt im Immunsystem dar, was man besonders deutlich sieht, wenn die T-Zellen zum Beispiel infolge einer HIV-Infektion nicht mehr funktionieren und zum Zusammenbruch der Abwehr führen. Nur mit einem normalen T-Zell-Repertoire kann der Körper eine effiziente Immunabwehr zustande bringen, da gerade diese Zellen darüber entscheiden, wann eine Reaktion notwendig ist und die übrigen Abwehrzellen koordinieren.

Den T-Zellen kommt die wichtige Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst zu, die zur Verhinderung von Autoimmunerkrankungen essentiell ist. Dazu dient ein ganz spezieller Entwicklungsprozess, der zu einem frühen Zeitpunkt nach der Geburt in einem spezialisierten primären lymphatischen Organ, dem Thymus, stattfindet.

Lymphozyten wandern dazu aus dem Knochenmark in den Thymus. Dort werden die verschiedenen Abschnitte des Genoms, die für den T-Zell-Rezeptor kodieren, durch die Funktion des RAG-Gen (engl.: recombinase activating gene, Rekombinase-aktivierendes Gen) miteinander kombiniert und ergeben von Zelle zu Zelle einen anderen Rezeptor, der auf der individuellen Zelle aber immer identisch ist.

Kommt es zur Bildung eines T-Zell-Rezeptors, der in der Lage ist MHC-Moleküle (engl.: major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex) in Kombination mit CD4 oder CD8 (engl.: cluster of differentiation, Unterscheidungsmerkmal),

die nach der Rezeptorbildung beide exprimiert werden, zu binden, so bekommt die Zelle ein Überlebenssignal (positive Selektion) und kann sich weiter entwickeln.

Die Zellen, die MHC-II erkennen werden später zu T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) und tragen CD4, wohingegen die MHC-I erkennenden Lymphozyten zu CD8 exprimierenden zytotoxischen T-Zellen werden [Janeway, 5. Auflage].

Die entstandenen T-Zellen können im Grunde alle möglichen Antigene erkennen und somit auch die körpereigenen Strukturen bedrohen. Daher muss noch ein wichtiger Schritt vollzogen werden, der negative Selektion genannt wird und zur zentralen Toleranz führt. Sie ist abhängig von den Thymusepithelien, die den neu entstandenen T-Zellen Selbstantigene in Kombination mit MHC-Molekülen präsentieren. Binden die T-Zellen mit sehr hoher Affinität an solche Komplexe, so werden diese Zellen gezielt getötet, da sie potentiell selbstreaktiv sind. Es überleben nur solche T-Lymphozyten, die die körpereigenen Antigene schwach binden.

Nach der Reifung im Thymus gelangen die T-Zellen über den Blutkreislauf in den Körper, wo sie zwischen den verschiedenen Organen hin und her wandern, bis sie über Antigenkontakt aktiviert werden und ihre Funktion erfüllen [Alberts, 3. Auflage].

2.1.2.2 Aktivierung und Spezialisierung

Treffen die T-Zellen in der Peripherie auf ihr Antigen, so gehen sie in ein Aktivierungsstadium über. Ausnahmen bilden nur eine zu starke Aktivierung, die zum induzierten Zelltod führt oder eine chronische Aktivierung, die die Zellen anerg also reaktionlos macht. Diese Mechanismen haben eine wichtige Rolle, den Körper vor Autoaggression zu schützen und werden auch periphere Toleranz genannt.

Kommt es zu einem Eintritt in das Effektorstadium, so organisieren die CD4⁺-T-Zellen die Abwehr gegen das entsprechende Antigen. Die Th-Zellen interagieren mit Hilfe von Zytokinen und durch direkten Kontakt von Oberflächenmolekülen mit anderen Zellen des Immunsystems und regeln zum Beispiel die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen oder die Umwandlung von Makrophagen zu Epitheloidzellen bei der Abwehr von Tuberkuloseerregern.

Anhand des Zytokinmusters lassen sich die Th-Zellen in verschiedene Untergruppen unterteilen, die sich auch spezifischen Infektionen zuordnen lassen.

Unter Th0-Zellen versteht man frisch aktivierte Th-Zellen, die noch in der Lage sind sowohl Th1 als auch Th2 spezifische Zytokine zu bilden. Man nimmt an, dass sie nur ein Durchgangsstadium in die eine oder andere Richtung darstellen. Wahrscheinlich können sie aber auch bei der Abwehr von Pathogenen eigenständige Funktionen wahrnehmen.

Als erste Hauptgruppe gibt es die Th1-Zellen, die durch das proinflammatorische IFN γ als Effektorzytokin gekennzeichnet sind und vorzugsweise der zellvermittelten Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen dienen.

Werden die T-Zellen allerdings zu Th2-Zellen polarisiert so liegt dem meist das Interleukin IL-4 zu Grunde, das, wenn es in ausreichender Menge bei der Antigenpräsentation vorhanden ist, die T-Zelle zur Produktion von IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 anregt. Diese Zytokine haben eine Th1-abortive Wirkung und somit einen antiinflammatorischen Effekt. Th2-Zellen haben eine wichtige Rolle auf der humoralen Seite der Immunantwort. Außerdem können sie Mastzellen und eosinophile Granulozyten aktivieren und spielen somit bei der Bekämpfung von Parasiten eine große Rolle.

Aus so aktivierten T-Zellen können Gedächtniszellen entstehen, die durch ihre lange Lebensdauer und durch ihre erhöhte Reaktivität eine wichtige Rolle bei der Abwehr von wiederholt auftretenden Infektionen spielen.

2.1.3 Antigen-präsentierende Zellen

2.1.3.1 Die Funktion des MHC

Die Antigen-präsentierenden Zellen stellen eine heterogene Zellgruppe dar, zu denen verschiedene Typen immunkompetenter Zellen gehören. Beispiele sind die B-Zellen, die Monozyten-Makrophagen-Familie und die dendritischen Zellen, die als Gemeinsamkeit die Expression von MHC-II haben. Diese dienen dazu Fremdanigene, also solche die über Endozytose in die Zelle aufgenommen wurden, CD4⁺-T-Zellen zu zeigen, die dann entscheiden, ob eine Intervention notwendig ist [Janeway, 5. Auflage].

Unter einem Antigen versteht man die kleinste Einheit, die dazu in der Lage ist eine spezifische Immunantwort durch T-und B-Zellen in Gang zu setzen. Während B-Zellen

ihr Antigen direkt erkennen können, gelingt dies bei Th-Zellen nur, wenn das Antigen von MHC-II präsentiert wird [Alberts, 3. Auflage].

Die MHC-Komplexe sind Transmembranproteine, die an ihrer Extrazellulärdomäne eine Furche bilden, in der Peptide von der Größe zwischen 10 und 15 Aminosäuren gebunden werden können. Da nur etwa zwei Aminosäuren für die Bindung am MHC-Molekül selbst wichtig sind und ansonsten sehr viele Kombinationen möglich sind, können auch entsprechend viele verschiedene Peptide gebunden werden.

Die MHC-Gene gehören neben ihrer großen Zahl (beim Menschen 3 für MHC-I und 3 für MHC-II) auch zu denen mit den größten Polymorphismen im Erbgut überhaupt, was darin begründet liegt, dass eine bestimmte Zahl von MHC-Molekülen nur eine bestimmte Zahl an Fremdan antigenen bindet. Kombiniert man nun verschiedene MHC-Moleküle miteinander, so kann man ein breites Spektrum an Fremdan antigenen abdecken. Mit jeder neuen Art von MHC-Molekül muss allerdings auch eine neue Art T-Zelle eingeführt werden. Eine Th-Zelle erkennt nämlich ihr spezifisches Antigen immer in Kombination mit dem dazu gehörigen MHC-II-Molekül. Die Anzahl der verschiedenen MHC-Allele stellt also einen Kompromiss der Evolution zwischen ausreichender Präsentation von Fremdan antigenen und effizienter T-Zell-Herstellung dar [Alberts, 3. Auflage].

Neben den MHC-II-Molekülen gibt es noch die MHC-I-Moleküle, die praktisch auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden und ihrerseits alle Peptide zeigen, die am Proteasom im Zytosol durch Abbau endogener Proteine entstehen können.

Virale oder von der Zelle selbst produzierte veränderte Proteine können so an der Oberfläche CD8 positiver Zellen präsentiert werden und führen bei Erkennung als fremd zu einer Zerstörung der Zelle [Alberts, 3. Auflage].

2.1.3.2 Die Funktion kostimulatorischer Moleküle

Kostimulatorische Signale sind für eine nachhaltige Aktivierung der Th-Zellen essen tiell [Carreno, 02; Coyle, 01; Sharpe, 02].

Ein primäres kostimulatorische Signal geben die APC über CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) an den CD28-Rezeptor auf der Th-Zelle, die dadurch einen aktivierenden Impuls bekommt. CD80 und CD86 können gleichzeitig das CTLA-4-Molekül der Th-Zelle er-

kennen, das ein inhibitorisches Signal auf die Th-Zelle überträgt und zur Abschwächung der Th-Antwort führt.

Tabelle 1: Wichtige kostimulatorische Moleküle [Carreno, 02; Watts, 99]

Molekül (Familie)	Ligand (Familie)	Wirkung der Interaktion auf T-Zellen
CD80, (B7)	CD86 CD28 (Ig-Superfamili- lie)	induziert IL-2-Produktion und Überleben von T-Zellen; verhindert Anergie/Tod
CD80, (B7)	CD86 CTLA-4 (Ig-Superfamili- lie)	wirkt inhibitorisch auf T-Zellen
ICOS-L (B7)	ICOS (CD28-Subfamili- e)	nur auf aktivierten T-Zellen; erhöht IL-10 aber nicht IL-2
ICAM-1,-2,-3 (Ig-Superfamili- e)	LFA-1 CD11a/CD18 (Integrin)	Adhäsion und Reorganisation des Zytoskeletts während T-Zellaktivierung
OX40-L (TNF-Familie)	OX40 (TNF-Rezeptor- Familie)	auf aktivierten T-Zellen; verstärkt die Proliferation von Th1- und Th2-Effektor-T-Zellen
CD40	CD40-L	aktiviert B-Zellen, Antikörperklassenwechsel
PD1 (B7)	PD-L1/2	inhibiert T- und B-Zellantworten

In der Tabelle sind wichtige kostimulatorische Moleküle Antigen-präsentierender Zellen (1. Spalte) mit ihrem entsprechenden kostimulatorischen Rezeptor auf der T-Zelle (2. Spalte) und ihrer in diesem Zusammenhang bedeutenden Funktion (3. Spalte) dargestellt. Die kostimulatorischen Moleküle werden aufgrund ihrer Strukturverwandtschaft zu Familien zusammengefasst (siehe Klammern).

Weiterhin kennt man Moleküle, die eine starke Homologie mit CD80 und CD86 bzw. deren Liganden haben und zur B7-Familie zusammengefasst werden. Ein Beispiel ist das ICOS-Molekül der Th-Zellen, das dem CD28 strukturverwandt ist und den ICOS-Liganden als eigenen B7-ähnlichen Bindungspartner hat. PD-1 ist wie CTLA-4 ein in-

inhibitorischer Rezeptor, der zwei B7-ähnliche Liganden hat. Darüber hinaus nimmt man an, dass es in der B7-Familie noch weitere Mitglieder gibt, die man bis dato nicht kennt.

Einige wichtige kostimulatorische Moleküle, darunter auch Mitglieder anderer Familien, sind mit ihrer Hauptfunktion für die T-Zellen in der Tabelle aufgeführt.

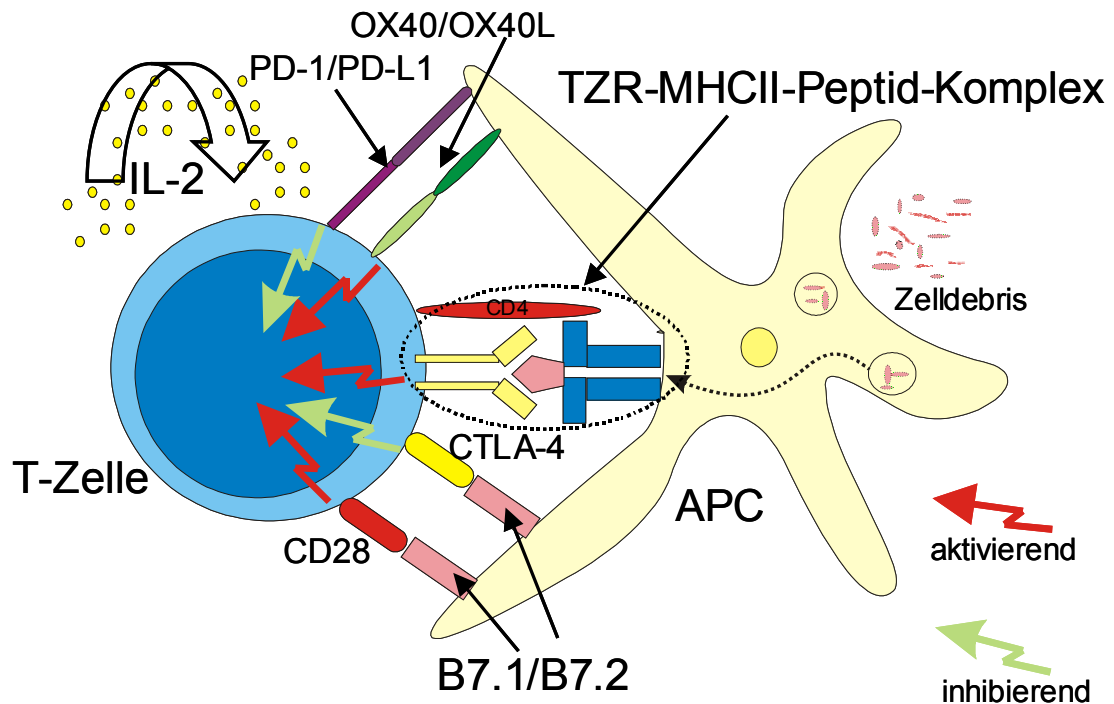


Abbildung 1: Aktivierung von Th-Zellen

In der Abbildung sind die verschiedenen Komponenten der Th-Zellaktivierung dargestellt. Das antigene Material wird von der Antigen-präsentierenden Zelle (APC) aufgenommen, verdaut und an ein MHC-II Molekül gekoppelt auf der Zelloberfläche präsentiert. Der T-Zellrezeptor erkennt das an den MHC-II gekoppelte Antigen und gibt das Signal 1 zur Aktivierung der Th-Zelle. Dieser Komplex wird durch CD4 stabilisiert. Bei entsprechender Kostimulation wird die autokrine Stimulation mit Interleukin-2 (Signal 2) ausgelöst. Die beteiligten kostimulatorischen Moleküle können sowohl aktivierende (CD28, OX40, etc.) als auch inhibierende Effekte (PD-1, CTLA-4) haben.

2.2 Autoimmunkrankheiten

Die Evolution hat uns mit einem ausgeklügelten System versorgt, das uns vor Infektionen durch Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten zu schützen vermag. Voraussetzung dafür war die Entwicklung des adaptiven Immunsystems, dessen Vorteil darin liegt, sich den raschen Veränderungen der Krankheitserreger anpassen zu können, die sich so ständig dem Zugriff des Immunsystems entziehen wollen.

Ein essentieller Bereich stellt dabei die Unterscheidung von Selbst und Nicht-Selbst dar. Nur wenn die Noxe differenziert erkannt wird, können effektive Reaktionen gegen die Krankheitserreger eingeleitet werden ohne gleichzeitig gegen körpereigene Strukturen gerichtet zu werden. Diese immunologische Toleranz gegenüber dem Selbst ist eine der schwierigen aber auch vitalen Aufgaben des Immunsystems und unterliegt daher vielen Sicherungsmechanismen, die man bisher nur unvollständig versteht.

Werden diese Sicherungsmechanismen ausgehebelt, so kommt es zu einem fehlgeleiteten Angriff gegen die eigenen, gesunden Zellen. In den meisten Fällen dieser sogenannten Autoimmunkrankheiten ist ein genauer Pathomechanismus noch nicht bekannt und auch die heutigen Therapien beschränken sich zum Großteil auf eine unspezifische Suppression des Immunsystems [Janeway, 5. Auflage].

Die genetische Ausstattung spielt eine wichtige Rolle bei der Ätiologie von Autoimmunprozessen. Man hat bestimmte Genpolymorphismen gefunden, das heißt bestimmte Allele von Genen, die gehäuft bei Erkrankten vorkommen, aber auch in der Normalbevölkerung zu finden sind [Compston, 02].

Gewisse genetische Konstellationen scheinen dem Individuum also eine Neigung zu verleihen, eine Autoimmunkrankheit zu entwickeln. Ungeklärt ist allerdings bis heute, was die wirklichen Auslöser sind und ob es „die“ Autoimmunkrankheit mit „dem“ Pathomechanismus für alle Krankheiten überhaupt gibt.

Die wichtigsten Polymorphismen hat man dabei in den MHC-Genen gefunden, wo verschiedene Allele mit jeweils verschiedenen Krankheiten assoziiert werden. So hat man eine starke Koinzidenz vom MHC HLA-B27 (engl.: human leukocyte antigen, humanes Leukozytenantigen) und dem Morbus Bechterew gefunden, wohingegen auch ein Teil

der Normalbevölkerung Träger dieses Allels ist und diese Menschen nicht erkranken [Gerber, 77].

Was man bisher sagen kann ist, dass einfache Erklärungsmodelle dem Phänomen der Autoimmunität nicht gerecht werden und auch, wenn es zu durchaus ähnlichen und konsistenten Krankheitsbildern kommt, die Äthiologie sicher nicht bei allen Erkrankten gleich ist.

Die Komplexität des Immunsystems wird bisher in seiner ungestörten Funktion noch nicht voll verstanden und die vielen Mechanismen, die die immunologische Toleranz gewährleisten, bzw. im Falle der Autoimmunität gestört sind, werden die Forschung sicher noch auf Jahre beschäftigen.

2.3 Hypothesen zur Entstehung von Autoimmunität

Bei Autoimmunkrankheiten kommt es zu einer fehlgeleiteten Immunantwort, die zu Reaktionen gegen Selbstantigene und im Laufe der Zeit zu einer chronischen Schädigung des betroffenen Organs oder des gesamten Körpers führt. Die Ursachen dafür werden bis dato noch unzureichend verstanden [Kamradt, 01].

2.3.1 Unvollständige Deletion autoreaktiver T-Zellen

Die entscheidende Rolle bei der Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst kommt den T-Zellen zu. Dazu werden die T-Zellen, bevor sie den Thymus verlassen, daraufhin überprüft, ob sie nicht eigene Strukturen angreifen werden und somit unbrauchbar sind. Um diese Aufgabe erfüllen zu können, ist der Thymus in der Lage, verschiedene körpereigene Antigene zu exprimieren und den neu entstandenen T-Zellen in Verbindung mit MHC-I und II zu präsentieren [Janeway, 5. Auflage].

Allerdings kommt es auch vor, dass gar ein Antigen überhaupt nicht präsentiert wird oder nur eine Variante davon, wie sie durch eine abweichende Bearbeitung der genetischen Information entstehen kann.

Tritt ein solcher Fall ein, so entgehen diese T-Zellen der Deletion und können bei Kontakt mit ihrem Antigen in der Peripherie Schaden anrichten.

Für diese These spricht, dass man bei SJL-Mäusen in experimentellen Studien eine erhöhte Zahl von autoreaktiven Zellen gegen ein bestimmtes Epitop des Proteolipid-Proteins (PLP) gefunden hat, was tatsächlich auf eine Variante in der Proteinexpression im Thymus zurück zu führen ist und auch mit einer erhöhten Suszeptibilität der Tiere für experimentelle autoimmune Enzephalitis einher geht [Anderson, 00].

Dagegen spricht, dass die Präsenz von autoreaktiven T-Zellen ein häufiges Phänomen auch bei gesunden Individuen ist und per se nicht zu der Entstehung von Autoimmunkrankheiten zu führen scheint [Benoist, 01; Grogan, 99; Hemmer, 99; Kamradt, 01].

2.3.2 Molekulare Mimikry

Grundlage dieser Theorie ist, dass Infektionserreger der Immunabwehr dadurch entgehen wollen, dass sie ihre immundominanten Epitope so verändern, dass sie durch die Sequenzähnlichkeit mit körpereigenen Antigenen nicht erkannt werden und somit keine Abwehrreaktion auslösen.

Zur Autoimmunität kommt es laut dieser Hypothese genau dann, wenn eine Th-Zelle, die primär das Antigen des Erregers erkennt durch die Infektion aktiviert wird und durch die Ähnlichkeit mit dem körpereigenen Antigen auch dieses angreifen kann. Das bedeutet also, dass es infolge einer spezifischen Infektion zur Entwicklung einer bestimmten Autoimmunkrankheit kommt.

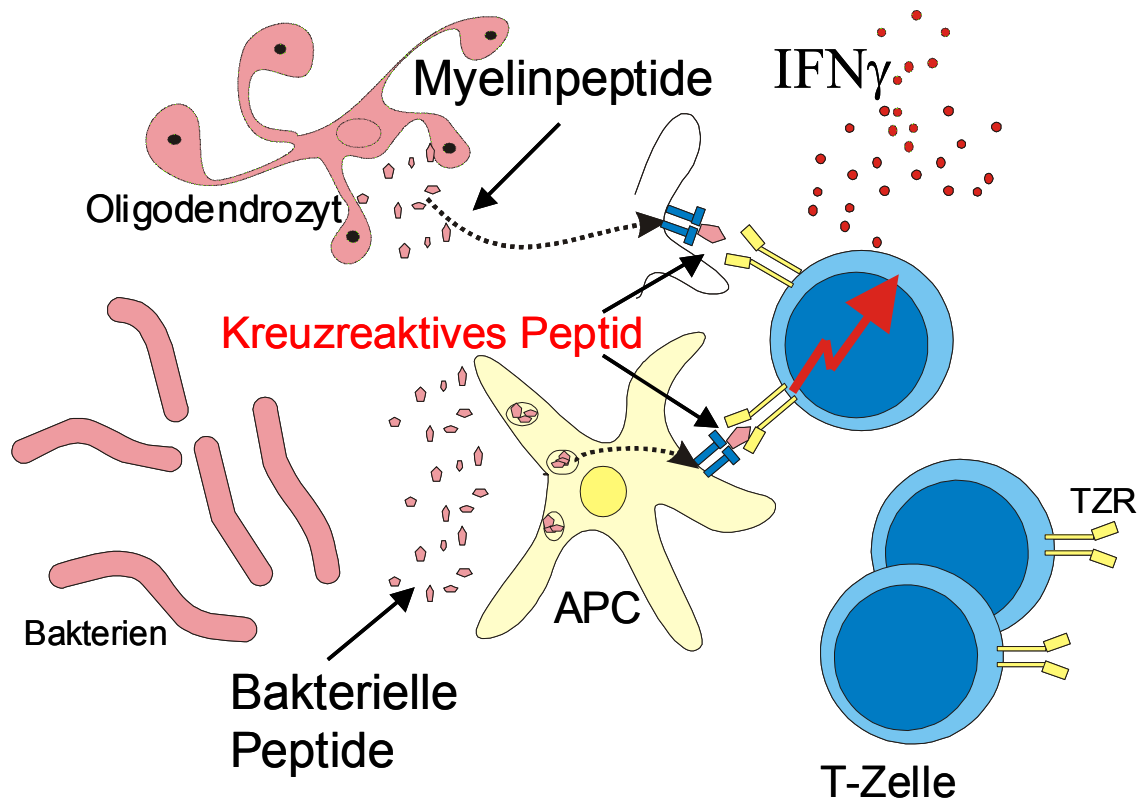


Abbildung 2: Molekulare Mimikry schematisch am Modell der EAE

Die Antigen-präsentierenden Zellen (APC) nehmen Zelldebris von bakteriellen Peptiden auf, verdauen sie und präsentieren sie über MHC-II den Th-Zellen. Die Th-Zelle erkennt das mikrobielle Peptid mit ihrem T-Zellrezeptor (TZR), wird aktiviert und geht in das Effektorstadium über. Bei der Passage durch den Körper trifft sie im ZNS auf APC, die ihr Myelinpeptide präsentieren, die dem mikrobiellen Peptid ähnlich sind und von der Th-Zelle ebenfalls erkannt werden. In der Folge kommt es durch die neuerliche Aktivierung zur Autoaggression der Oligodendrozyten im ZNS.

In der Tat hat man auch solche T-Zellen gefunden, die in der Lage waren, sowohl Myelinpeptide als auch mikrobielle Peptide zu erkennen [Grogan, 99; Hemmer, 97; Wucherpfennig, 95].

Darüber hinaus konnte die Immunisierung mit solchen Peptiden EAE auslösen. Über die letzten zwanzig Jahre gab es verschiedene epidemiologische und experimentelle Ansätze, die ein bestimmtes Pathogen finden wollten, mit dem kreuzreaktive enzephalitogene Th-Zellen über ein bestimmtes Antigen aktiviert werden und MS auslösen können. Jedoch fand man keinen In-vivo-Beweis beim Menschen für eine spezifische Infektion, die EAE auslösen kann. Darüber hinaus erbrachten die epidemiologischen Arbeiten, die die MS-Auslösung bzw. MS-Schübe mit bestimmten Infektionen oder Impfungen in Verbindung zu bringen suchten [Gautam, 98; Ufret-Vincenty, 98], dass

keine der verdächtigen Infektionen bei MS-Kandidaten überdurchschnittlich häufig vorkam [Panitch, 94; Sibley, 85; Zipp, 99].

Die wissenschaftliche Erkenntnis weist dagegen eher dahin, dass die Erkennung von bestimmten mikrobiellen Peptiden und Selbstantigenen durch einen einzigen T-Zellrezeptor eine normale, häufig beobachtbare Tatsache ist und per se keine Autoimmunkrankheiten auslöst [Bach, 02; Grogan, 99; Kurtzke, 93].

2.3.3 Bystander-Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen

Diese Hypothese stützt sich auf den epidemiologischen Beweis, dass Autoimmunkrankheiten vermehrt im Kontext von Infektionen vorkommen. Im Unterschied zur molekularen Mimikry wird nicht eine spezifische Infektion gefordert, sondern man nimmt an, dass das entzündliche Milieu, das im Rahmen jeder Infektion entsteht der entscheidende Faktor ist.

Weiterhin greift man die Beobachtung auf, dass sich bei allen Individuen autoreaktive Zellen finden lassen, die allerdings mangels Aktivierung keine Schäden anrichten.

Nun weiß man, dass T-Zellen neben dem Antigenstimulus viele verschiedene kostimulatorische Signale von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) benötigen, um nachhaltig aktiviert zu werden [Carreno, 02; Coyle, 01; Sharpe, 02]. Die Qualität und die Stärke solcher zusätzlicher Signale wird dabei weitgehend durch Interaktionen von Mikroorganismen und deren immunogene Bestandteile über das angeborene Immunsystem mit den APC bestimmt [Hugot, 01; Janeway, Jr., 02; Ogura, 01; Takeda, 03].

Jedoch müssen die zellulären und molekularen Mechanismen, die Infektionen und angeborene Immunität verbinden, noch aufgeklärt werden. In wieweit sie die Erkennung von Selbstantigenen beeinflusst, die ja folgenlos, protektiv aber auch pathologisch sein kann, bleibt Gegenstand der Forschung und ist auch Thema dieser Arbeit.

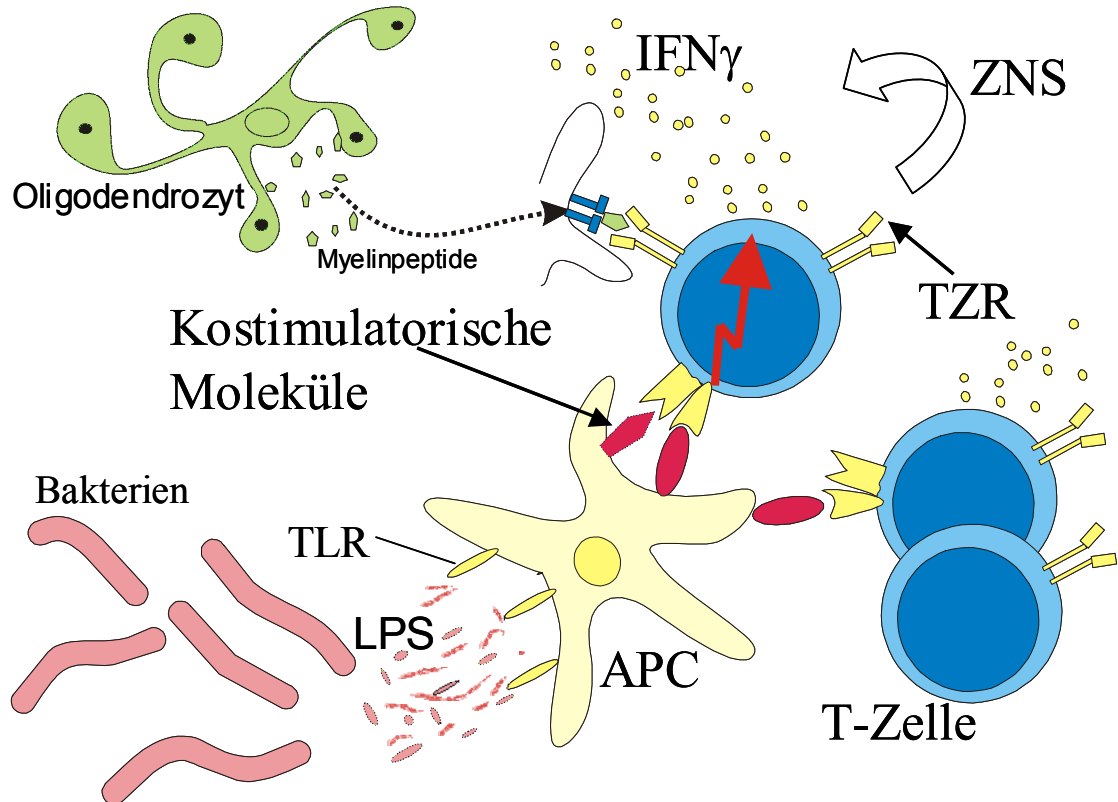


Abbildung 3: Bystander-Aktivierung von Th-Zellen schematisch am Modell der EAE

Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien (LPS) werden beim Zerfall von Bakterien frei und aktivieren über die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) die Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Die APC exprimieren darauf hin vermehrt kostimulatorische Moleküle und können ihrerseits Th-Zellen aktivieren. Diese Aktivierung ist unabhängig von einer Interaktion zwischen MHC-II, Peptid und T-Zellrezeptor (TZR). Befindet sich unter den aktivierten Th-Zellen eine, die mit ihrem TZR ein Myelinautoantigen erkennen kann, so kann es nach der lokalen Reaktivierung mit dem Antigen im ZNS zu einer Autoaggression gegen die Oligodendrozyten kommen.

2.4 Die experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) als Tiermodell der MS

Zur Erforschung von humanen Krankheiten ist man auf die Hilfe von Tiermodellen angewiesen, da die Forschung ex vivo immer das Problem hat, die Komplexität eines Organismus und die vielen Variablen, die man noch nicht kennt, nur unzureichend zu reproduzieren. Darüber hinaus kann auch nur hier die klinische Relevanz von in-vitro beobachtbaren Phänomenen bewiesen werden.

Im Falle der EAE hat man ein induzierbares Krankheitsmodell gefunden, das zwar vom Auslösemechanismus stark von der MS abweicht, dessen Klinik, Histopathologie und Laborparameter der humanen Krankheit dennoch erstaunlich ähneln [Lassmann, 83].

Man appliziert den suszeptiblen Tieren dazu Bestandteile der Nervenbahnen des ZNS zusammen mit Adjuvantien, woraufhin die Mäuse eine demyelinisierende Erkrankung entwickeln, die man experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) nennt. Diese Krankheit ist das Resultat einer durch Th-Zellen vermittelten Autoaggression, die gegen ganz bestimmte immundominante Epitope von Proteinen des zentralen Nervensystems (ZNS) gerichtet ist [Kuchroo, 02]. Auch im menschlichen System konnte bei der MS eine vitale Rolle von CD4⁺-Th-Zellen gezeigt werden [Antel, 94].

Im Falle der hier hauptsächlich verwendeten SJL-Maus erkennen die autoreaktiven T-Zellen das MBP₈₅₋₉₉-Peptid in Verbindung mit dem murinen MHC-II H2A^s.

Die Tiere entwickeln nach einem Intervall von 10-14 Tagen eine aufsteigende Lähmung, die wie bei der MS erst schlaff und bei fehlender Erholung später spastisch ist. Im Unterschied zur humanen Krankheit kommt es allerdings nicht zu diffusen Lähmungen, da die Prädispositionsstellen bei der Maus vor allem das Rückenmark und nicht das Gehirn sind. Durch die additive Wirkung der verstreut liegenden Entzündungsherde kommt es also zuerst zu Lähmungserscheinungen der langen Nervenbahnen, somit im Schwanzbereich, dann in den Beinen und erst am Ende in den Versorgungsbereichen mit den kürzesten Nervenleitungen.

Histologisch imponiert die Krankheit als eine akute disseminierte Enzephalomyelitis. Dabei sieht man wie bei der klassischen MS - einer chronischen disseminierten Enzephalitis- mononukleäre, perivaskuläre Infiltrate, zusätzlich aber auch Zonen akuter Demyelinisierung und Fibrinablagerungen.

Für die EAE konnte man eine entscheidende wenn nicht sogar essentielle Rolle der Th-Zellen für die Krankheitsauslösung nachweisen. Man transferierte dafür in-vitro voraktivierte enzephalitogene T-Zellen in naive Mäuse und konnte dadurch die Krankheit bei den Tieren auslösen. Dies gelang weder mit anderen Zellpopulationen noch mit naiven autoreaktiven T-Zellen [Kuchroo, 02; Zamvil, 90].

Die beiden Erkrankungen unterscheiden sich also primär in der Auslösung, die eben bei der MS spontan passiert und bei der EAE induziert wird.

In dieser Arbeit soll die Wirkung von Infektionen, insbesondere auf die Auslösung von Schüben bei schon etablierter MS, bzw. EAE untersucht werden, die sich in diesem Stadium weitgehend ähneln. Erkenntnisse aus diesem Tiermodell müssen jedoch auf Zutreffen bei der MS überprüft werden.

3 Zielsetzung

Der genaue Mechanismus, wie Infektionen und Autoimmunität zusammen hängen, ist zurzeit noch nicht bekannt. Grundsätzlich kann man aber davon ausgehen, dass die angeborene Immunität eine große Rolle spielt bei der Entstehung und Chronifizierung von autoreaktiven Prozessen.

In dieser Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- I. Welchen Einfluss haben Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien (LPS) auf den Verlauf der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) im Modell transgener und normaler Mäuse?
- I. Führt LPS in-vitro zu einer Aktivierung der im Pathomechanismus der EAE essentiellen T-Helfer-Zellen (Th-Zellen)?
- II. Wird die LPS-induzierte Aktivierung von Th-Zellen Antigen-abhängig oder Antigen-unabhängig vermittelt?
- III. Welche Rolle spielen lösliche Mediatoren und kostimulatorische Moleküle bei der LPS-induzierten Bystander-Aktivierung von Th-Zellen?

4 Material und Methoden

4.1 Laborartikel

4.1.1 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	137,0 mM NaCl 2,7 mM KCl (Roth) 1,5 mM KH_2PO_4 (Merck) 8,1 mM Na_2HPO_4 (Sigma) pH 7,2
Wasch-und Sortierpuffer PBS/BSA	PBS 1% (w/v) bovines Serumalbumin 0,5% Natriumazid (NaN_3 , Sigma)
Zellkulturmedium (CM) für murine Zellen	RPMI-1640 (Seromed) 10% Fetales Kälberserum (FCS, Sigma) 50 μM 2-Mercaptoethanol (Sigma) 100 U/ml Penicillin (Seromed) 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin (Seromed)
Waschmedium	RPMI-1640 5% Kulturmedium
Einfriermedium	FCS 10% DMSO
FACS-Puffer (PBA)	PBS 1% (w/v) BSA 0,5% Natriumazid (NaN_3 , Sigma)
Zellfixierlösung (PFA)	PBS 2% Paraformaldehyd
Saponin-Puffer	PBA 0,5% (w/v) Saponin

4.1.2 FACS-Antikörper und Sekundärfarbstoffe

Die kommerziell erhältlichen Antikörper wurden bei Pharmingen gekauft. Die mit DRFZ gekennzeichneten wurden von Heidi Hecker-Kia und Tuula Geske aus Hybridomüberständen gewonnen und anschließend mit FITC, PE, Cy5, Biotin oder Digoxigenin gekoppelt.

Tabelle 2 Murine Oberflächenantikörper

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
α -m-CD4-Biotin	GK 1.5	5 μ g/ml	DRFZ
α -m-CD4-DIG	GK 1.5	5 μ g/ml	DRFZ
α -m-CD3-FITC	145-2C11	1,5 μ g/ml	DRFZ
α -m-CD3	145-2C11	3 μ g/ml	Pharmingen
α -m-CD28	37.51	2,5 μ g/ml	Pharmingen
α -m-CD69-Biotin	H1.2F3	5 μ g/ml	Pharmingen
α -m-CD62L-CY5	MEL14	0,53 μ g/ml	DRFZ

Tabelle 3 Murine intrazelluläre Antikörper

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
α -m-TNF α -FITC	MP6-XT22	2,5 μ g/ml	Pharmingen
α -m-TNF α -APC	MP6-XT22	2,5 μ g/ml	Pharmingen
α -m-IFN γ -PE	XMG1.2	1 μ g/ml	Pharmingen
α -m-IFN γ -DIG	AN18.17.2	1,6 μ g/ml	DRFZ
α -m-IL2-APC	JES6-5H4	2,5 μ g/ml	Pharmingen

Tabelle 4 Murine blockierende Antikörper

α -m-CD80	16-10-A1	20 μ g/ml	RKI
α -m-CD86	GL1	20 μ g/ml	RKI
α -m-CD18	M18/2.a.12.7	20 μ g/ml	RKI
α -m-CD54	BE29G1	20 μ g/ml	RKI
α -m-ICOS-L	MIL-4495	20 μ g/ml	RKI
CTLA4-hulg		20 μ g/ml	RKI
α -m-MHC-II*	M5/114.15.2	20 μ g/ml	RKI

*Kontrollantikörper; bindet nicht auf Zellen von SJL-Mäusen

Tabelle 5 Sekundärantikörper, Isotypenkontrollen und sonstige

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
APC Isotype	rat IgG1	2,5 µg/ml	Pharmingen
APC Isotype	rat IgG2b	2,5 µg/ml	Pharmingen
FITC Isotype	rat IgG1	2,5 µg/ml	Pharmingen
PE Isotype	rat IgG1	1 µg/ml	Pharmingen
SA-APC	/	0,5 µg/ml	Pharmingen
SA-PE	/	0,5 µg/ml	Pharmingen
SA-PerCP	/	0,5 µg/ml	Pharmingen
α-dig-PE	Fab-Schaf (Roche)	1 µg/ml	DRFZ
α-dig-CY5	Fab-Schaf (Roche)	1 µg/ml	DRFZ
CFSE		5 nM	BD
Ratten IgG	/	10 µg/ml	Jackson Mice

4.1.3 Sonstige Reagenzien und Chemikalien

Brefeldin A	Sigma
Ciclosporin A	Novartis
CFDA-SE	Molecular Probes
Complete Freund's Adjuvans (CFA)	Sigma
Diethylether	Sigma
DMSO	Sigma
DNase	Sigma
Ficoll	Sigma
IL-2 (human, rekombinant)	R&D
KollagenaseI	Sigma
KollagenaseVIII	Sigma
Lipopolysaccharid LPS (<i>Salmonella typhi-murium</i>)	Sigma
Percoll	Sigma
Pertussis-Toxin (PTx)	Sigma
PHA	Sigma
Saponin	Sigma
Staphylokokken-Enterotoxin B	Sigma
Trypanblau Lösung (0,4%)	Sigma

Die Peptide MBP₈₅₋₉₉ (ENPVVHFFKNIVTPR) und MBP_{AC1-11} (Ac-ASQKRPSQRSK) wurden in der Arbeitsgruppe von Jens Schneider-Mergener (Institut für medizinische

Immunologie, Charité, Berlin) konventionell nach den Standard-Fmoc-Protokollen mit einem Multiple Peptide Synthesizer (Abimed, Langenfeld) hergestellt. Die Reinheit der Peptide wurde durch HPLC bestimmt und die Zusammensetzung mit MALDI-TOF Massenspektroskopie überwacht.

4.1.4 Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchsmaterialien

MACS-Separationssäulen (LD, LS)	Miltenyi
Kanülen, Spritzen	HSW, Braun
Kryo-Tubes	Nunc
Petrischalen, 48- und 96- Lochplatten	Corning/Costar
Rundbodenröhrchen 5 ml (FACS)	Falcon
Transwell 0,4µm Porengröße	Costar
Vacutainer	BD
Zellsieb (70µm)	Falcon

Reaktionsgefäße, Pipettenaufsätze und sonstige Verbrauchsmaterialien stammen von den Firmen Biozym, Eppendorf, Corning und Sarstedt

4.1.5 Geräte

Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson
Inkubatoren, B6, BB16 CU	Heraeus
Magnetrührer	
Neubauer Zählkammer	Brand
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss
Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Pipetten	Gilson
Sterilbank, HeraSafe	Heraeus
Stickstofftank	
Teesieb	
Ultraschallgerät, Sonoplus HD70	Bandelin
Vortexer	Scientific Industries
Wasserbad	
Zentrifugen,	Heraeus
Megafuge 1.0R	
Biofuge 22R	
Biofuge pico	
Biofuge fresco	

4.2 Tiermodelle

Die verwendeten Mäuse wurden unter speziell pathogenfreien (SPF) Bedingungen in der Tierzucht des DRFZ (Bundesinstitut für Risikobewertung) gezüchtet und während den Versuchen im Tierstall Mitte des DRFZ unter SPF-Bedingungen (spezifisch pathogenfrei) gehalten.

Die folgenden Mausstämme wurden benutzt:

4.2.1 Mausstämme PL/J und B10.PL

Die PL/J-Maus wird seit 1951 beim Jackson Laboratory gezüchtet und zeigt eine mittlere Suszeptibilität für experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) mit spätem Beginn und hoher Mortalität. Der Stamm B10.PL wurde aus der PL/J-Maus durch wiederholte Rückkreuzung auf C57BL/10Sn gewonnen, hat den gleichen MHCII und trägt ähnliche Merkmale bezüglich der EAE-Suszeptibilität wie der Donorstamm. In den durchgeführten Experimenten wurde das an Position 1 azetylierte Peptid MBP_{AC1-11} zur Auslösung von EAE verwendet, das bei einem Maus-MHCII H2^u das immundominante Epitop des Myelin-basischen Proteins (MBP) darstellt.

4.2.2 Mausstämme α k.o. und MBPTCR α k.o. (T⁺ α ⁻)

Die T⁺ α ⁻-Maus stellt ein monoklonales, transgenes Modell für experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) mit schwerem Verlauf und hoher Mortalität dar. Bei den Tieren ist das Gen für die endogene α -Kette des T-Zellrezeptors zerstört, was zu einem kompletten Fehlen der T-Zellen führt. Durch das Einschleusen des Gens für einen enzephalomyelitogenen T-Zellrezeptors aus der PL/J-Maus, der in diesem Fall spezifisch MBP_{AC1-11} erkennt, kommt es zur Produktion von CD4⁺-Zellen, die zu 99% dieses Epitop erkennen.

Die Tiere haben einen gemischten C57/BL6- und SV129-Hintergrund und sind homozygot für den Maus-MHCII H2^u.

4.2.3 Mausstamm DBA/DR2

Die DBA/DR2-Maus stellt ein transgenes, humanisiertes Mausmodell für EAE dar. Dabei tragen die Tiere einen humanen, enzephalitogenen T-Zellrezeptor, menschliches HLA-DR2 und humanes CD4. Das immundominante Epitop ist im Zusammenhang mit

HLA-DR2 das MBP₈₅₋₉₉ –Peptid. Immunsiiert man die Tiere mit diesem Antigen, so kann man eine milde bis mittelstarke, typische EAE mit geringer Mortalität beobachten. Dieser Mausstamm hat einen gemischten Hintergrund von C57BL6 und DBA1-Mausstämmen.

4.2.4 Mausstamm SJL/J

Die SJL/J-Maus ist ein sehr verbreitetes Modell für EAE, insbesondere wegen einem der MS sehr ähnlichen schubförmigen Krankheitsverlaufs bei Auslösung mit dem PLP₁₃₉₋₁₅₁-Peptid. In den durchgeführten Versuchen wurde dagegen das Peptid MBP₈₅₋₉₉ verwendet, das ein weiteres immundominantes Epitop bei der SJL-Maus darstellt. Die sich nach Immunisierung entwickelnde EAE ist von der Klinik her sehr milde, heilt meist voll aus und hat eine sehr geringe Mortalität. Weitere Schübe wurden selten beobachtet.

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Zellkultur

Alle Materialien, die in Kontakt mit Zellen kamen wurden sterilisiert. Die bei der Sektion der Tiere verwendeten Instrumente wurden 5 min abgekocht und anschließend in 70 % Ethanol desinfiziert. Sämtliche weiteren Geräte, Puffer und Medien wurden für 20 min bei 120 C und 1 bar Überdruck autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Beim Umgang mit den Zellen wurde unter einer Sterilbank gearbeitet, die regelmäßig mit 70 % Ethanol desinfiziert wurde.

Die Zellen wurden in Brutschränken bei einer Temperatur von 37 C, einer Luftfeuchte von 95 % und einer CO₂ Konzentration von 5 % kultiviert.

Zum Einfrieren wurden die Zellen in 1ml Einfriermedium aufgenommen, über Nacht bei – 70C gelagert und am darauf folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

4.3.2 Zellgewinnung

4.3.2.1 Milz

In dieser Arbeit wurden für In-vitro-Versuche Maus-Milzzellen verwendet, deren Gewinnung im Folgenden beschrieben wird.

Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Dann wurde mittels eines medianen Längsschnitts am Bauch das Peritoneum freigelegt und durch einen Schnitt entlang des linken Rippenbogens eröffnet. Die dann sichtbare Milz wurde mit einer desinfizierten Pinzette gelöst und in Waschmedium aufgenommen.

Alle folgenden Arbeiten wurden in einer Sterilbank und auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt.

Die Milz wurde durch ein Teesieb gedrückt, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in einer 10 ml Glaspipette weitgehend zerkleinert und in 50 ml Waschmedium gewaschen. Alle Waschschrte wurden wie folgt durchgeführt:

Die Zellen wurden in 50 ml Volumen in einem 50 ml Röhrchen (Corning) aufgenommen und mit 470x g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet resuspendiert.

Da in der Milz auch viele Erythrozyten vorhanden sind, die sich durch Zentrifugieren nicht entfernen lassen, wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dabei wurde die geringere osmotische Stabilität der roten Blutkörperchen gegenüber den weißen dazu benutzt, gezielt die Erythrozyten mit einem hyposmolaren Puffer zu zerstören. Zu dem entstandenen Pellet wurden dafür 10 ml Lysispuffer und 5 ml Waschmedium hinzu pipettiert, sofort abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nach einem weiteren Waschschrte wurde das nun weiße Pellet in 10 ml Waschmedium aufgenommen. Davon wurden 10 µl abgenommen, 1:10 mit Trypanblau gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop wurden dann die Zellen in 16 Feldern eines Quadrats ausgezählt (n), wobei tote Zellen dadurch ausgeschlossen werden können, dass sie den Farbstoff aufnehmen und blau erscheinen. Die Gesamtzahl der vitalen Zellen ergibt sich dann aus der folgenden Formel:

$$\text{Gesamtzellzahl} = n \times 10 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10 (\text{Volumen}) \times 10^4$$

Danach wurden die Zellen wieder gewaschen und auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen pro ml in Vollmedium (CM) gebracht.

4.3.2.2 Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden an der Mesenterialwurzel bzw. im Bereich der tiefen lateralen Halsregion dargestellt und entfernt. Alle folgenden Schritte waren identisch zur Aufarbeitung der Milzzellen.

4.3.2.3 Zentrales Nervensystem

Zur Gewinnung von Lymphozyten aus dem Hirn musste zuerst das gesamte Blut aus dem Gefäßsystem entfernt werden.

Das Tier wurde dazu mit Diethylether in einem Becherglas betäubt und nach Einsetzen der Apnoephase die Bauchhaut durch einen Medianschnitt durchtrennt. Das Peritoneum wurde eröffnet, so dass man vom Bauchraum her in den Thorax ca. 3mm links und rechts des Sternums einschneiden konnte, wobei darauf geachtet wurde, die Thoracica-interna-Arterien zu schonen. Klappt man nun das Sternum nach oben weg; so hatte man freien Zugang zum Herzen und konnte in die linke Kammer eine Kanüle einführen. Der rechte Vorhof wurde eröffnet, um ein Ausfließen des Blutes zu ermöglichen. 20ml PBS wurden langsam über den Ventrikel in den Kreislauf appliziert, was im Regelfall zu einer ausreichenden Entfernung des Blutes aus dem Gefäßsystem führte.

Dann wurden Schädel und Wirbelsäule von umliegendem Gewebe befreit und mit Hilfe einer kleinen Schere eröffnet. Dadurch wurden Rückenmark und Gehirn sichtbar und konnten mit Hilfe einer dünnen Pinzette gelöst und auf eine Petrischale gelegt werden. Dort wurden sie mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in 25 ml CM aufgenommen, das bereits DNase und Kollagenase enthielt. Dieses Gemisch wurde in eine sterile Flasche mit Magnetrührer überführt und für eine Stunde in einem 37 °C warmen Wasserbad ordentlich gerührt.

Nach Ablauf der Zeit wurde der Flascheninhalt über ein Zellsieb gegeben und gut gewaschen. Dann wurde das Pellet in 10 ml 40 % Percoll resuspendiert und jeweils 5 ml davon auf 3 ml 70 % Percoll in einem 12 ml Zentrifugenröhrchen überschichtet.

Anschließend wurde bei Raumtemperatur für 30min bei 550g ohne Bremse zentrifugiert, sofort die Interphase abgenommen und in WM gewaschen.

Die Zellen wurden in CM aufgenommen, gezählt und auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen pro ml in Vollmedium (CM) gebracht.

4.3.3 Zellsortierung

Für einige Versuche war es notwendig, bestimmte Zellpopulationen zu isolieren. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu das MACS-Zellsortierungssystem (Magnet associated Cell Sorting) von Miltenyi benutzt.

Prinzip:

Das Macs-System beruht auf der spezifischen Markierung von Molekülen der Zelloberfläche lebender Zellen mit einem monoklonalen Antikörper, der an magnetische Mikropartikel so genannte „beads“ (engl.: bead, Kügelchen; 20-100 nm Durchmesser) gebunden ist. Gibt man derart behandelte Zellen über eine ferromagnetische Säule, die sich in einem starken Magnetfeld befindet, so werden selektiv die markierten Zellen zurück gehalten. Entfernt man die Säule nun aus dem Magnetfeld, können die nun nicht mehr haftenden Zellen leicht ausgespült werden.

Die Zellaufreinigung kann dabei zur Anreicherung (positive Selektion) oder zur Depletion (negative Selektion) bestimmter Zellpopulationen benutzt werden, wobei jeweils spezielle Säulen je nach der angestrebten Reinheit bzw. Ausgangszellzahl verwendbar sind.

Die Macs-Sortierung wurde zur Isolierung von CD4⁺-Zellen und Antigen präsentierenden Zellen (APC) benutzt, wobei die CD4 tragende Fraktion angereichert bzw. entfernt wurde.

Spezielles Vorgehen:

Für die Macssortierung wurden die Zellen in entgastem PBS/BSA gewaschen und das Pellet in 400 µl pro 10⁸ Zellen aufgenommen. Dazu wurden 100 µl/10⁸ Zellen α-m-CD4-beads (gekoppelter Antikörper) gegeben und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde wieder mit PBS/BSA gewaschen und das Pellet in 500 µl Puffer aufgenommen.

Anschließend wurden die Zellen über eine vorgespülte Positiv-Selektionssäule vom Typ LS, die in einem Midimacs-Magneten eingespannt war, gegeben. Die Negativfraktion wurde gewaschen, in 1ml Puffer aufgenommen und anschließend über eine Depletionsssäule vom Typ LD gegeben und die dabei aufgefangene Negativfraktion als APC verwendet. Die Positivfraktion der LS-Säule wurde gewaschen, in 1ml Puffer aufgenommen und über eine weitere LS-Säule gegeben. Die gewonnene Positivfraktion wurde als CD4⁺-Zellen verwendet.

Die Reinheit der beiden Fraktionen wurde durch eine Oberflächenfärbung auf CD3, CD4 und CD8 mit dem FACSCalibur bestimmt und lag durchgehend bei über 95 %.

4.3.4 Zellkultur

4.3.4.1 CFSE und Aktivierungsmarker

Für die Untersuchung von Proliferation und Aktivierungsmarker wurden die Zellen nach Gewinnung, etwaiger Färbung und Einstellung auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in 48-Loch-Platten mit je 1ml Volumen überführt. Dann wurden die verschiedenen Zusätze wie MBP-Peptide, LPS oder Staphylokokken-Enterotoxin-B, (SEB) hinzu pipettiert und die Zellen für drei Tage im Brutschrank inkubiert.

Die folgenden Schritte werden im Abschnitt Durchflusszytometrie behandelt.

4.3.4.2 Zytokine

Für die Untersuchung der Zytokinproduktion wurden die Zellen identisch behandelt mit dem einzigen Unterschied, dass sie nur für einen Tag inkubiert wurden. Das weitere Vorgehen wird im Kapitel Durchflusszytometrie behandelt.

4.3.5 T-Zellrezeptor-Blockade durch Ciclosporin A

Ciclosporin A wurde in dieser Arbeit verwendet, um das vom T-Zellrezeptor ausgehende aktivierende Signal zum Kern und somit eine Antigen-spezifische Aktivierung von Th-Zellen zu verhindern.

Ciclosporin hemmt wie Rapamycin und FK506 das Enzym Calcineurin, das eine wichtige Stellung im durch Calcium vermittelten Signalweg im Zytosol hat. Fällt dieser Signalweg aus, so kann eine Aktivierung der Th-Zellen über den T-Zellrezeptor nicht statt finden [Yang, 01].

Dazu wurde den Zellen an Tag 0 vor Zugabe weiterer Reagenzien 50nM Ciclosporin A in 10µl CM zugegeben und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Erst dann wurden weitere Zusätze wie MBP-Peptid oder LPS hinzu pipettiert. An Tag 1 wurden für 6h 5µg/ml Brefeldin A hinzu gegeben, dann wie üblich fixiert und die Zahl der Zytokinproduzenten durchflußzytometrisch gemessen.

4.3.6 Gewinnung von Überstand aus LPS-Kulturen

Zur Gewinnung von Überständen aus LPS-Kulturen wurden SJL-Milzzellen mit 2µg/ml LPS für einen bzw. drei Tage inkubiert und geerntet. Die Suspension wurde wie üblich zentrifugiert und der Überstand über Nacht bei -20°C eingefroren. Am Folgetage wurde

der Überstand einer neuen SJL-Milzzellkultur im Verhältnis 1:1 zu frischem Kulturmedium zugefügt.

4.3.7 Verminderung von Kostimulation durch blockierende Antikörper

Um die Bedeutung der Kostimulation für die indirekte Aktivierung von Th-Zellen durch LPS wurden verschiedene blockierende Antikörper verwendet, die freundlicher Weise von Herrn Dr. rer. nat. Andreas Hutloff (RKI, Berlin) zur Verfügung gestellt wurden.

Dazu wurden Milzzellen wie üblich gewonnen und an Tag 0 mit den entsprechenden blockierenden Antikörpern für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 15µg/ml MBP₈₅₋₉₉ bzw. 2µg/ml LPS hinzugegeben und über Nacht im Inkubator belassen. An Tag 1 wurden dann 5µg/ml Brefeldin A für 6 h hinzugegeben, die Zellen fixiert und die Zytokinproduktion durchflusszytometrisch bestimmt.

4.4 Durchflusszytometrie

4.4.1 Prinzip

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie dazu benutzt, die Expression von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Zytokinen und die Proliferation von Zellpopulationen darzustellen.

Zwei physikalische Phänomene werden dafür genutzt, nämlich einerseits die natürliche Streuung von Licht an den Strukturen der Zellen und andererseits die Fluoreszenz von Farbstoffen, die durch spezifische Antikörper an die Zellen gebunden werden. Von Fluoreszenz spricht man, wenn bestimmte Moleküle dazu in der Lage sind, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und Licht einer anderen Wellenlänge zu emittieren. Dabei ist die Intensität des produzierten Lichts proportional zur Konzentration des Farbstoffs. Wenn also ein deutliches Signal bei der Messung zu erkennen ist, so kann man davon ausgehen, dass viele Farbstoffmoleküle involviert sind und entsprechend viele Antikörper an die „hellen“ Zellen gebunden sind.

Dazu werden die darzustellenden Moleküle auf bzw. in den Zellen mit monoklonalen Antikörpern spezifisch markiert, die im einfachen Falle den fluoreszierenden Farbstoff direkt tragen. Ist der spezifische Antikörper mit nicht-fluoreszierendem Biotin oder Di-

goxigenin verbunden, so muss man in einem zweiten Färbeschritt die eigentliche Fluoreszenz mit einem „Sekundärantikörper“ (Streptavidin +Farbstoff bzw. α -Digoxigenin +Farbstoff) an den spezifischen Antikörper anlagern (indirekte Färbemethode). Dadurch, dass es verschiedene Farbstoffe wie FITC, PE oder Cy5 gibt, deren emittiertes Licht in nur leicht überlappenden Bereichen liegt, kann man Mehrfachfärbungen anfertigen und diese zueinander in Beziehung setzen.

Zur Messung der Streuung und Fluoreszenz wurde ein FACSCalibur verwendet, der die Zellen einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an zwei verschiedenen Lasern (480 nm Argonlaser und 630 nm Diodenlaser, 200mW) vorbeileitet und das gestreute und emittierte Licht durch ein System von optischen Linsen, Spiegeln, Filtern und Photodetektoren leitet, so dass das optische Signal in ein elektrisches Signal verwandelt wird. Dieses elektrische Signal wird dann mit Hilfe eines Computers weiter verarbeitet, so dass eine graphische Darstellung und statistische Auswertung möglich werden.

Am FACSCalibur können sechs verschiedene Parameter aufgenommen werden:

Tabelle 6: Messparameter am FACSCalibur (BD)

Parameter	proportional zu	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Forward Scatter (FSC)	Streuung längs des Laserstrahls (Zellgröße)		
Sideward Scatter (SSC)	Streuung quer zum Laserstrahl (Granularität)		
Fluoreszenz 1	Intensität von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	492 nm	520-530 nm
Fluoreszenz 2	Phycoerythrin (PE)	488 nm	570-576 nm
Fluoreszenz 3	Propidiumiodid (PI) PerCP	495 nm 490nm	639 nm 675 nm
Fluoreszenz 4	Cy5 und Allophycocyanin (APC)	625-650nm	660-670 nm

4.4.2 Oberflächenfärbung

Etwa 10^6 bis 10^7 Zellen wurden in ein 5 ml FACS-Rundbodenröhrchen überführt und in FACS-Puffer (PBS/BSA/Azid) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet aufgeschüttelt. Die Zellen wurden mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Ratten IgG und 0,75 $\mu\text{g/ml}$ α -m-Fc-Rezeptor für 10 min bei 4°C geblockt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern.

Dann wurden die Primärantikörper dazu gegeben und für 10 min in der angegebenen Konzentration mit den Zellen inkubiert (Volumen 100 μl). Unter Primärantikörper versteht man die spezifisch an die Oberflächenmoleküle bindenden Antikörper, die meist in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 7,5 $\mu\text{g/ml}$ verwendet worden sind. Nach einem Waschschrift folgt die eventuelle Färbung mit einem Sekundärantikörper, der ebenfalls herunter gewaschen werden muss.

Zuletzt werden die Zellen in 300 μl Puffer aufgenommen und die Streuung und Fluoreszenz am FACSCalibur gemessen. Die Daten wurden dann mit dem Programm FCS Express analysiert. Tote Zellen wurden durch die Färbung mit Propidiumiodid ausgeschlossen und standardmäßig wurden Lymphozyten anhand von Größe und Granularität im FSC-SSC-Bild ausgewählt und betrachtet.

4.4.3 Intrazelluläre Färbung

Um eine ausreichende Menge an intrazellulären Zytokinen zu bekommen, wurden bei allen Ansätzen vier bis sechs Stunden vor der Fixierung 5 $\mu\text{g/ml}$ Brefeldin A zu den Kulturen hinzu pipettiert, das den intrazellulären Transport vom Golgi-Apparat zur Zellmembran zum Erliegen bringt und folglich zu einer Anreicherung der sonst sofort sezernierten Zytokine führt.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass es im Fall intrazellulärer Antigene nicht ausreicht, die färbenden Antikörper zu einer Zellsuspension hinzu zu geben, da diese die Zellmembran nicht durchdringen können und somit das Zellinnere nicht erreichen. Daher muss dem eigentlichen Färbeschritt noch eine Fixierung der Zellen und eine Permeabilisierung der Zellmembran voraus gehen.

Praktisch sah das so aus, dass die Zellen nach der Oberflächenfärbung in PBS gewaschen wurden und das Pellet in 1 ml Fixierungslösung 2 % Paraformaldehyd (PFA) aufgenommen und für 20 min bei 4 °C inkubiert wurde. Danach wurde wieder mit PBS

gewaschen. Jetzt konnte an der Zellmembran manipuliert werden, ohne die Zellstruktur zu zerstören. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen in einer 0,5 % Saponinlösung gewaschen, was dazu führte, dass die Zellmembran der fixierten Zellen perforiert und somit zugänglich für die färbenden Antikörper wurde. Alle weiteren Schritte wurden immer in 0,5 % Saponin durchgeführt. Wie auch bei der Oberflächenfärbung war es notwendig zu blocken und zwar mit 20 µg/ml Ratten-IgG und 0,75 µg/ml α -m-Fc-Rezeptor für 10 min bei 4 °C. Der anschließende Färbeschritt war ebenfalls identisch zur Oberflächenfärbung. Im Unterschied zur Oberflächenfärbung konnte man biotinylierte Antikörper nicht für die Intrazellulärfärbung benutzen, da Biotin auch natürlicher Weise in den Zellen vorkommt und somit eine unspezifische Färbung zu Stande kommen würde.

Darüber hinaus ist die unspezifische Bindung von färbenden Antikörpern intrazellulär oft so stark, dass in dieser Arbeit routinemäßig eine Isotypenkontrolle durchgeführt wurde. Dazu wurde ein Antikörper der gleichen Klasse, der spezifisch für ein nicht auf den untersuchten Zellen vorkommendes Antigen ist und mit dem gleichen Farbstoff gekoppelt ist, mit der entsprechenden Zellprobe inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die entstandene Färbung wurde bei der Bewertung der Färbung mit den spezifisch bindenden Antikörpern berücksichtigt.

4.4.4 Färbung mit CFSE

Die Färbung mit Carboxyfluoreszein-diazetatsuccinimidylester (CFSE) unterscheidet sich insofern stark von dem vorhergehenden, als dass sie nicht durch einen Antikörper zustande kommt, sondern sich der Farbstoff direkt an Proteine im Zytosol in lebenden Zellen anlagern kann.

Kommt es nun zu einer Zellteilung, so trägt jede Zelle folglich nur noch die Hälfte der ursprünglichen Molekülzahl und wird somit von Teilung zu Teilung „dunkler“. Sich nicht teilende Zellen zeigen im FACS somit eine hohe Farbtintensität und sich häufig teilende Zellen nehmen immer weiter an Intensität ab.

Der Vorteil im Vergleich zu konventionellen Proliferationsassays mit radioaktivem Thymidin besteht darin, dass die Proliferation von bestimmten Zellpopulationen genau betrachtet werden kann.

Rein praktisch sieht die Färbung so aus, dass die Zellen in PBS gewaschen werden und das Pellet in etwa. 1×10^8 Zellen/ml resuspendiert und für 5 min bei Zimmertemperatur mit 5 μ M CFSE inkubiert wird. Anschließend wird wieder mit PBS gewaschen und das Pellet in CM aufgenommen.

4.5 Experimente an lebenden Tieren

Alle in dieser Arbeit vorgenommenen Versuche an lebenden Tieren entsprachen den Institutsrichtlinien und folgten den staatlichen Gesetzen.

4.5.1 Das Modell der EAE

Die experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) ist eine T-zell-abhängige entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems bei Mäusen und Ratten, die zu einer akuten disseminierten Enzephalomyelitis mit dem klinischen Bild einer aufsteigenden Lähmung führt.

Histologisches Äquivalent dazu ist eine entzündliche Infiltration des zentralen Nervensystems mit Zerstörungen der weißen Substanz und Gliaarben.

Das Krankheitsbild wird ausgelöst durch die Applikation von enzephalitogenen Antigenen, die aus Hirnsubstanz, daraus aufgereinigten Proteinen der Myelinscheiden oder deren immundominanten, synthetisierten Peptiden bestehen können. Diese müssen allerdings unter Verwendung bestimmter Adjuvanzen appliziert werden.

Die Verläufe und die Histologie unterscheiden sich dabei von Modell zu Modell, allerdings lässt sich die Krankheit in allen Modellen durch CD4-positive Zellen aus erkrankten Mäusen auf naive Tiere des gleichen Mausstamms übertragen.

4.5.2 Induktion der EAE

Alle Mausstämme wurden nach dem gleichen Protokoll immunisiert, wobei sich nur das Antigen der Positivkontrolle und die verabreichte Menge unterschieden. In jedem Experiment gab es eine Positivkontrolle mit dem enzephalitogenen Antigen, eine Negativkontrolle, die nur die Adjuvanzen mit PBS erhielt und die Experimentalgruppe, die Adjuvanzen mit LPS erhalten hat.

An Tag 0 wurden dafür 100µl der zu testenden Substanz mit 100µl komplettem Freund's Adjuvanz (CFA) durch Ultraschall emulgiert und der Maus auf jeder Seite der Schwanzbasis 100µl der Emulsion subkutan gespritzt. Noch in der selben Sitzung und an Tag 2 wurden der Maus jeweils 200ng Pertussistoxin (Ptx) in 100 µl PBS intravenös injiziert. Ab dann wurden die Mäuse jeden Tag auf Lähmungen kontrolliert, wobei im Regelfall ab Tag 10 mit den ersten Lähmungen zu rechnen war.

Diese wurden anhand des folgenden klinischen Index bewertet:

1. Der Schwanz ist gelähmt. (Schwanzparalyse)
2. Die Hinterbeine sind in ihrer Funktion stark eingeschränkt. (Paraplegie)
3. Die Hinterbeine sind gelähmt. (Paralyse)
4. Die Vorderbeine sind gelähmt. (Tetraplegie)
5. Die Maus ist moribund.

4.5.3 Zweitimmunisierung mit LPS

Für diese Experimente wurden nur SJL/J-Mäuse verwendet.

Dazu wurden 200µg MBP₈₅₋₉₉ in 70µl PBS mit 70µl CFA emulgiert und der Maus an Tag 0 in die rechte Schwanzbasis subkutan gespritzt. Am gleichen Tag und an Tag 2 wurden der Maus noch jeweils 200ng Pertussistoxin in 100µl PBS intravenös verabreicht. Über einen Zeitraum von 40 Tagen wurden die Mäuse dann anhand des obigen klinischen Indexes bewertet und an Tag 40 in zwei vergleichbare Gruppen geteilt. Dabei erhielt Gruppe 1 an Tag 40 100µl einer Emulsion aus PBS und CFA (1:1), während Gruppe 2 100µl einer Emulsion aus 50µg LPS gelöst in PBS und CFA (1:1) erhielt. Beiden Gruppen wurden an Tag 40 und 42 jeweils 200 ng Pertussistoxin in 100µl PBS intravenös appliziert. Bis zum Ende des Experiments an Tag 78 wurden die Tiere täglich anhand des oben aufgeführten klinischen Indexes bewertet.

Pro Gruppe wurden mindestens sechs Tiere verwendet, um eine signifikante Aussage zu erhalten. Insgesamt wurde das Experiment fünf Mal durchgeführt.

4.5.4 Aufarbeitung für die Histologie

Zur Konservierung der histologischen Strukturen des zentralen Nervensystems (ZNS) hat sich eine Fixierung mit Paraformaldehyd bewährt. Dadurch werden die bald nach

dem Tod des Tieres eintretenden autolytischen Prozesse gestoppt, Zellstrukturen fixiert und Mikroorganismen getötet.

Dazu wurde das zur Histologie bestimmte Tier mit Diethylether in einem Becherglas betäubt und nach Einsetzen der Apnoephase die Bauchhaut durch einen Medianschnitt durchtrennt. Das Peritoneum wurde eröffnet, so dass man vom Bauchraum her in den Thorax ca. 3mm links und rechts des Sternums einschneiden konnte, wobei die Thora-cica-interna-Arterien zu schonen waren. Klappte man nun das Sternum nach oben weg, so hatte man freien Zugang zum Herzen und konnte in die linke Kammer eine Kanüle einführen. Der rechte Vorhof wurde eröffnet, um ein Ausfließen des Blutes zu ermöglichen. Dann wurden 20ml PBS langsam über den Ventrikel in den Kreislauf appliziert, was im Regelfall zu einer ausreichenden Entfernung des Blutes aus dem Gefäßsystem führte. Anschließend wurde über dieselbe Kanüle 20ml PBS-Lösung mit 4 % Paraformaldehyd verabreicht, die zu einer gleichmäßigen Fixierung der Maus führte. Der Schädel und die Wirbelsäule mit eingeschlossenem Rückenmark wurden freipräpariert und über Nacht in 2 % Paraformaldehyd nachfixiert. Danach wurden die Gewebe in PBS gelagert.

Alle weiteren Schritte wurden von Frau Dr. med. C. Stadelmann am Pathologischen Institut der Universität Göttingen durchgeführt.

Der histologische Index der experimentellen Enzephalomyelitis ergibt sich aus dem Quotienten aus der Zahl der entzündlichen Infiltrate auf jedem Rückenmarksquerschnitt und der Gesamtzahl der Rückenmarksquerschnitte. Die dadurch ermittelte Anzahl von Infiltraten pro Querschnitt korreliert dabei recht gut mit dem klinischen Index.

Außerdem werden die Verteilung der Läsionen im ZNS und die Zusammensetzung der sich in den Läsionen befindenden Zellen beurteilt.

5 Ergebnisse

Im Vorfeld zu dieser Promotionsarbeit stehen Versuche, die gezeigt haben dass ein MBP_{Ac1-11}/I-A^u-spezifischer T-Zellrezeptor eine große Anzahl an mikrobiellen Peptiden erkennen kann, die nur eine geringe Sequenzhomologie mit dem MBP_{Ac1-11} haben und doch EAE auslösen können [Grogan, 99].

Da bis heute unbekannt ist inwiefern diese Peptide bei Infektionen mit dem entsprechenden Krankheitserreger von den Antigen-präsentierenden Zellen aus Proteinen prozessiert und präsentiert werden, wurden T⁺ α -Mäuse mit *Salmonella typhimurium*-Lysat, das Ursprung einiger der kreuzreaktiven Peptide ist, injiziert. In der Folge entwickelte sich eine EAE, die hinsichtlich Inzidenz, Kinetik und Schweregrad der mit MBP_{Ac1-11} ausgelösten ähnlich war.

Da dieses Lysat aber neben einer Vielzahl an Antigenen auch noch weitere das Immunsystem beeinflussende Substanzen enthält, hat sich die Frage gestellt, ob auch *S.-typhimurium*-LPS als ein Vertreter dieser Gruppe EAE auslösen könne. Dabei hat sich nach Immunisierung von T⁺ α -Mäusen gezeigt, dass man alleine mit LPS-Immunisierung eine EAE auslösen kann, die ebenfalls bezüglich Inzidenz, Kinetik, Schweregrad und Histologie der durch *S.-typhimurium*-Lysat oder MBP_{Ac1-11} ausgelösten ähnlich ist. Darüber hinaus ist deutlich geworden, dass die Auslösung der EAE T-Zell-abhängig ist, da α -Mäuse, die den MBP_{Ac1-11}-spezifischen T-Zellrezeptor nicht tragen, keine EAE auf LPS-Immunisierung hin entwickeln (Promotionsarbeit von A. Nogai, Doktorand im der selben Arbeitsgruppe).

Inwiefern sich diese Ergebnisse auf genetisch nicht veränderte Tiere übertragen lassen und wie der genaue Mechanismus der LPS-Wirkung aussieht waren Gegenstand der vorgelegten Promotionsarbeit.

5.1 LPS löst bei normalen naiven Mäusen keine EAE aus

Die $T^+\alpha^-$ -Maus ist genetisch an zwei immunologisch wichtigen Stellen verändert. Es wurde ein enzephalitogener T-Zellrezeptor eingeschleust, der nur durch die zweite Veränderung, die Deletion der endogenen α -Kette zum fast ausschließlichen T-Zellrezeptor in den Tieren wird. Diese Deletion führt dazu, dass es neben den $MBP_{Ac1-11}/I-A^u$ -spezifischen T-Zellen kein endogenes T-Zellrezeptor-Repertoire mit $\alpha\beta$ -T-Zellen gibt.

Als erster Tierstamm auf dem Weg zu „normalen“ Mäusen wurde die transgene DBA/DR2-Maus ausgewählt, deren T-Zellrezeptor- α -Genlokus nicht verändert ist und die somit nicht monoklonal für den eingeschleusten humanen MBP_{85-99} -spezifischen T-Zellrezeptor ist. Diese Maus hat also neben den transgenen noch andere T-Zellen, so dass sie über ein endogenes T-Zell-Repertoire verfügt.

Als „normale“ Tiere wurden die Stämme PL/J, B10.PL und SJL verwendet, die ohne genetische Veränderung durch die Immunisierung mit bestimmten MBP-Peptiden eine EAE entwickeln.

Die Tiere der Experimentalgruppe wurden mit Lipopolysaccharid (LPS) in CFA (engl.: complete Freund's adjuvance; komplettes Freund's Adjuvanz) subkutan in die Schwanzbasis injiziert, Positivkontrollen mit dem enzephalitogenen MBP_{85-99} bzw. MBP_{Ac1-11} und die Negativkontrollen mit PBS - jeweils auch in CFA. Das verwendete enzephalitogene MBP-Peptid ist abhängig vom MHC. In Verbindung mit dem Maus-MHC H-2^u wird das Peptid MBP_{1-11} und in Verbindung mit H-2^s und humanem HLA-DR2 das MBP_{85-99} erkannt.

Anschließend wurden die Tiere über einen Zeitraum von mindestens vier Wochen täglich auf EAE-Symptome untersucht und erhielten Punktwerte nach dem im Methodenteil erwähnten klinischen Index.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse aller durchgeführten Versuche an naiven Wildtyp- und transgenen Mausstämmen gezeigt.

Ergebnisse

Tabelle 7: EAE-Inzidenz in verschiedenen Mausstämmen

Mausstamm	Immunogen	EAE-Inzidenz	Beginn/Tag Mittelwert (Bereich)	Klinischer Index Mittelwert (Bereich)
T ⁺ α ⁻ *	MBP _{Ac1-11}	16/17	13 (4-24)	5 (2-5)
T ⁺ α ⁻ *	PBS	4/15	15 (10-34)	1 (1-2)
T ⁺ α ⁻ *	LPS	13/15	21 (8-35)	3 (1-5)
α ⁻ *	LPS	0/10		0
DBA/DR2	MBP ₈₅₋₉₉	3/7	14 (13-17)	3
DBA/DR2	PBS	0/8		
DBA/DR2	LPS	0/9		
PL/J	LPS	0/6		0
B10.PL	MBP _{Ac1-11}	3/4	17 (12-21)	3
B10.PL	PBS	0/3		0
B10.PL	LPS	0/3		0
SJL	MBP ₈₅₋₉₉	2/4	14 (13-14)	1.5(1-2)
SJL	PBS	0/4		0
SJL	LPS	0/6		0

*Versuche durchgeführt von Axel Nogai (Doktorand in der gleichen Arbeitsgruppe) im Rahmen seiner Promotion

Bei den T⁺α⁻-Mäusen konnte Axel Nogai bei 13 von 15 Tieren EAE-Symptome mit LPS auslösen, wohingegen nur 4 von 15 Negativkontrollen an EAE erkrankten (*). Das gezeigte Ergebnis ist ein charakteristisches Beispiel, das in vielen anderen Experimenten reproduziert wurde.

Bei den DBA/DR2-Mäusen erkrankte in der PBS-Gruppe kein Tier an EAE wohingegen in der mit MBP-Peptid immunisierten Gruppe erwartungsgemäß drei von sieben Tieren Lähmungen entwickelten. Die mit LPS immunisierten Tiere zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Krankheitszeichen.

Der nächste Versuchsteil bezog sich auf die EAE-suszeptiblen Wildtypstämme PL/J, B10.PL und SJL, die nach Immunisierung mit den entsprechenden Antigenen EAE-Symptome entwickeln. Auch hier zeigten die Tiere aus der LPS-Gruppe keine klinischen Anzeichen für EAE, wohingegen die Immunisierung mit dem entsprechenden enzephalitogenen Peptid zur Auslösung von EAE führte. Die Immunisierung von EAE-suszeptiblen Tieren mit LPS führte nur in einem System, das monoklonal für einen en-

zephalitogenen T-Zellrezeptor war zur Auslösung von EAE. Weder bei normalen noch bei einer anderen für einen enzephalitogenen T-Zellrezeptor transgenen Maus, die neben dem eingeschleusten T-Zellrezeptor noch endogene T-Zellen besaß, konnte eine EAE mit LPS induziert werden.

5.2 LPS induziert EAE-Schübe bei in Remission befindlichen SJL-Mäusen

In vivo führte eine LPS-Immunisierung nur bei den monoklonalen T⁺ α -Tieren und nicht bei den naiven, normalen Mäusen zur Auslösung von EAE-Symptomen. Die erhöhte Zahl an enzephalitogenen T-Zellen in der DBA/DR2-Maus war ebenfalls nicht ausreichend, um mit LPS-Immunisierung EAE-Symptome auszulösen. Daher stellte sich die Frage inwiefern nicht nur eine Erhöhung der Zahl der autoreaktiven Zellen wichtig sein könnte, sondern auch eine Voraktivierung wichtig sein könnte.

Normale Mäuse wurden dazu mit MBP-Peptid immunisiert und damit eine in-vivo Voraktivierung im Sinne einer erhöhten Zahl von Th-Gedächtniszellen geschaffen. Im symptomfreien Intervall sollte dann überprüft werden, ob diese Voraktivierung die Tiere für eine EAE-Auslösung durch LPS empfänglich machen könnte. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde ein monophasisches EAE-Modell eingesetzt, bei dem die klinische Symptomatik im Verlauf weitgehend ohne Defektzustand abklingt.

5.2.1 Klinischer Verlauf der LPS-induzierten Schübe

Immunisiert man SJL-Mäuse mit MBP₈₅₋₉₉, so entwickeln die Tiere zu etwa 65 % der Fälle um den Tag 14 milde Lähmungen im Bereich von 1-3 nach dem klinischen Index, die sich bis zum Tag 40 meist vollkommen gebessert haben. In einigen Fällen wurde ein Defektzustand mit einem durchgehenden Punktwert von 1 (Schwanzlähmung) beobachtet.

An Tag 40 wurden die Tiere dann in zwei für die Gesamtheit repräsentative Gruppen geteilt, wobei die eine Gruppe LPS in CFA und die zweite als Negativkontrolle PBS in CFA erhielt. Die Mäuse wurden dann bis zum Tag 78 täglich auf das Vorhandensein von EAE-Symptomen untersucht und nach dem klinischen Index bewertet.

In der Grafik zur Prävalenz von EAE-Symptomen erkennt man an der Deckung der beiden Kurven, dass der erste Schub in beiden Gruppen von der Prävalenz her identisch verläuft. Die Reaktion auf die Zweitimmunisierung ist allerdings unterschiedlich. In der LPS-Gruppe kommt es zu einem erneuten Gipfel der Prävalenz, der den beim Primär Schub sogar übersteigt. In der PBS-Gruppe beobachtet man hingegen nur eine mäßige Zunahme der EAE-Prävalenz, die keine deutliche Häufung in Form eines Schubgipfels zeigt.

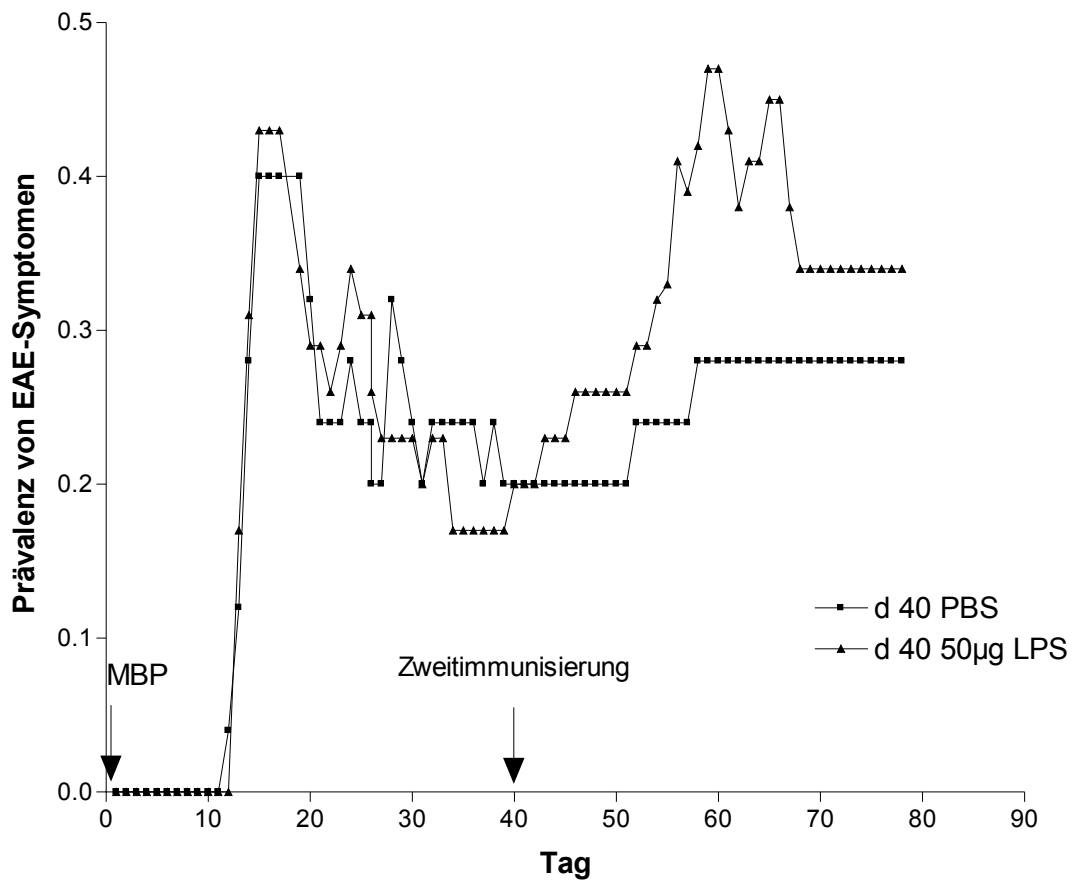


Abbildung 4: Prävalenz von EAE-Symptomen bei allen Tieren.

Der Punktwert stellt jeweils das Verhältnis von SJL-Mäusen mit EAE-Symptomen zur Gesamtzahl der Tiere in der entsprechenden Gruppe an dem angegebenen Tag dar; Mit ■ ist die EAE-Prävalenz derer gekennzeichnet, deren Zweitimmunisierung PBS/CFA war, mit ▲ die EAE-Prävalenz solcher, die LPS/CFA erhielten. Starb ein Tier oder wurde es euthanasiert, wurde es vom folgenden Tag an nicht mehr eingerechnet. Die erhobenen Daten stammen aus vier unabhängigen Experimenten mit einer Gesamtanzahl von PBS=25 (■) und LPS=35 (▲)

Der Versuch wurde viermal unter gleichen Bedingungen wiederholt und die Ergebnisse gesammelt in Tabelle 2 dargestellt. Um den Tag 14 nach der zweiten Immunisierung

Ergebnisse

kam es mit 13 von 28 Fällen zu einem vermehrten Auftreten von neuen EAE-Symptomen in der Experimentalgruppe gegenüber von nur 2 von 20 Tieren in der Kontrollgruppe. Darüber hinaus unterschieden sich auch die Werte des klinischen Indexes mit einem Maximum von 4 und einem Schnitt von 2,5 in der Experimentalgruppe im Vergleich zu einem Maximalwert von 2 in der Kontrollgruppe.

Somit entwickelte etwa jede zweite Maus (46,4%) in der Versuchsgruppe neue Symptome verglichen mit jeder Zehnten in der Kontrollgruppe.

Auf der Grundlage dieser Daten wurde von Frau Dipl.-Math. Dörte Huscher (DRFZ, Epidemiologie) eine statistische Auswertung nach dem exakten Fisher-Test durchgeführt, der für die Inzidenzraten nach Zweitimmunisierung mit LPS gegenüber PBS eine exakte Signifikanz von $p = 0,007$ zeigte.

Tabelle 8: Induktion von EAE-Schüben in SJL Mäusen

Immunisierung d01	EAE-Inzidenz auf MBP85-99 Immunisierung	Beginn2	Klinischer Index3	EAE valenz d40	Prä- an Index	Klinischer Index
MBP ₈₅₋₉₉	15/25 (60%) ^{ns}	17 (12-28)	1.8 (1-3)	5/25		1 ⁴
MBP ₈₅₋₉₉	24/35 (69%) ^{ns}	16 (13-23)	1.7 (1-3)	7/35		1 ⁴
Immunisierung d401	EAE Prävalenz an d40	Klinischer Index	EAE-Inzidenz auf Beginn2 die Zweitimmuni-sierung			Klinischer Index3
PBS	5/25	1 ⁴	2/20 ⁵	15 (12,18)		2
LPS	7/35	1 ⁴	13/28 ⁵	17 (8 –33)		2.5 (2-4)

¹ Die Mäuse wurden an Tag 0 mit MBP₈₅₋₈₉/CFA s.c. immunisiert, gefolgt von einer intravenösen Injektion von 200 ng Pertussistoxin am selben Tag und 48 h später. An Tag 40 wurde den Mäusen entweder PBS/CFA s.c. oder LPS/CFA s.c. verabreicht, jeweils gefolgt von i.v.-Injektionen von 200 ng Pertussistoxin an Tag 40 und Tag 42.

² Mittelwert (Bereich) des Auftretens von EAE.

³ Mittelwert (Bereich) des klinischen Indexes der Mäuse die EAE entwickelten.

⁴ Der klinische Index war 1 für alle Mäuse, die immer noch klinische EAE-Symptome an Tag 40 zeigten.

⁵ Das schließt nur die Tiere ein, die auf die zweite Immunisierung hin neue Symptome entwickelt haben. Alle Mäuse mit einem Punktwert von 1 blieben für den Rest des Beobachtungszeitraums bei diesem Wert.

^{ns} statistisch nicht signifikant

5.2.2 Histologische Untersuchung der LPS-induzierten Schübe

Die histopathologische Untersuchung wurde von Frau Dr. med. C. Stadelmann (Neuropathologie, Universität Göttingen) durchgeführt. Man konnte bei SJL-Mäusen während dem mit MBP ausgelösten ersten Schub perivaskuläre und subpiale zelluläre Infiltrate feststellen. Die spezifischen Färbungen zeigten, dass es sich vor allem um T-Zellen und Makrophagen handelt, darüber hinaus fand man auch wenige B-Zellen und einige polymorphnukleäre Granulozyten (a-e). Tiere, die an Tag 40 mit PBS immunisiert wurden und keinen neuen klinischen Schub hatten, zeigten an Tag 75 subpiale Narben, aber keine Zeichen für eine neue Entzündung (f-j). Im Gegensatz dazu sah man bei den Mäusen, die mit LPS immunisiert wurden und einen neuen Schub erlitten, weitreichende und stark zellreiche subpiale Läsionen mit Makrophagen, die den frühen Makrophagenmarker MRP-14 als Zeichen für eine kürzlich erfolgte Invasion von inflammatorischen Zellen in die Läsion tragen (k-o).

Die feingewebliche Untersuchung konnte zeigen, dass es bei den LPS-induzierten Schüben zu einer entzündlichen Reaktion im ZNS kam mit einer Invasion von B-Zellen, Makrophagen und T-Zellen, die zu einer perivaskulären Zerstörung des ZNS-Gewebes führte. Die entzündliche Reaktion zeigte sowohl von der Lokalisation als auch von der Art der beteiligten Zellen her Parallelen zu dem mit MBP-Peptid induzierten Schub.

Die Negativkontrollen mit der PBS-Zweitimmunisierung fielen nur durch piale Narben auf und gaben keinen Anhalt für eine frische bzw. exazerbierte Infektion in den betrachteten Rückenmarkquerschnitten.

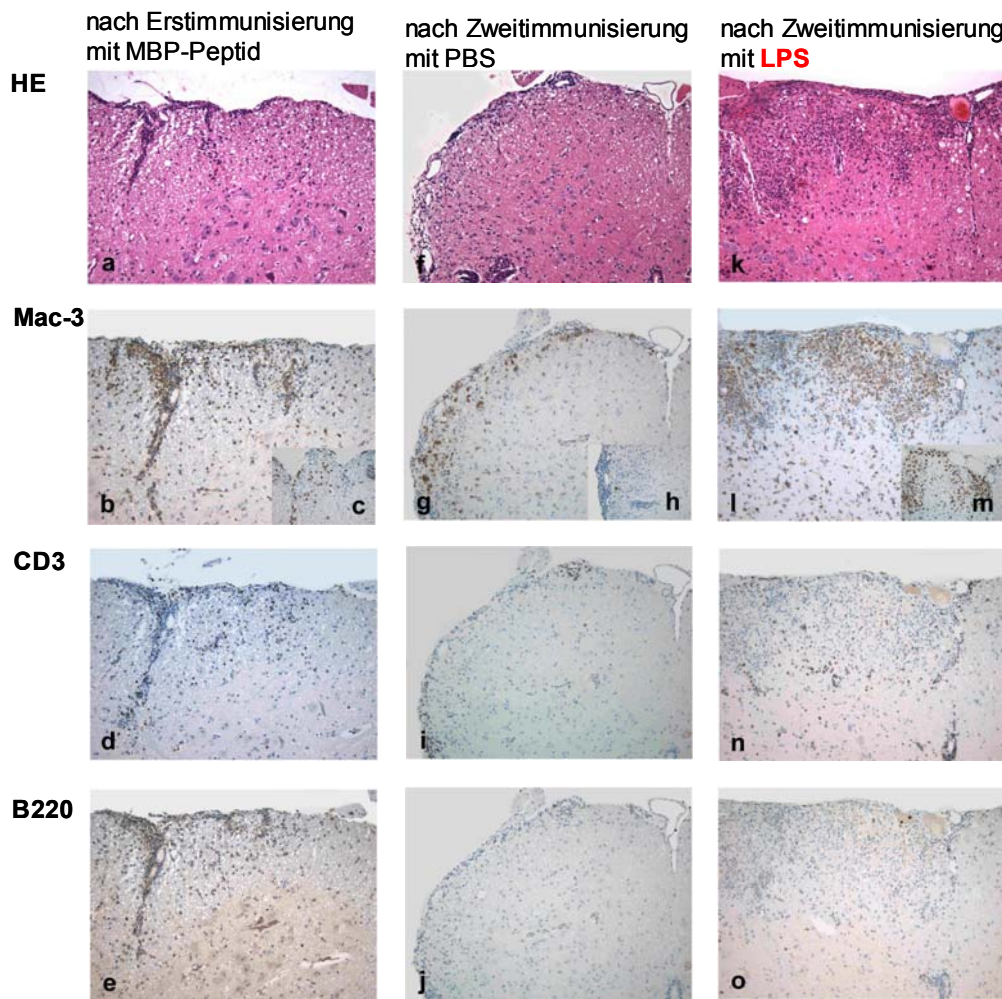


Abbildung 5: LPS-induzierte EAE-Schübe bei SJL-Mäusen

Die feingewebliche Untersuchung der EAE bei MBP85-99 immunisierten SJL zeigt am Tag 20 nach Immunisierung zur Zeit des ersten Schubs perivaskuläre und subpiale Infiltrate (HE-Färbung, a) mit Mac-3-positiven Makrophagen (b), die zum Großteil den frühen Makrophagenmarker MRP-14 (c) exprimieren. Weiterhin sieht man CD3-positive T-Zellen (d), wenige B220-positive B-Zellen (e) und einige polymorphkernige Granulozyten (a). Bei Tieren, die an Tag 40 mit PBS/CFA immunisiert wurden, erkennt man an Tag 75 subpiale Narben (f) mit schaumförmigen Makrophagen (g), von denen nur wenige MRP-14 tragen (h). Weiterhin sieht man wenige perivaskuläre T-Zellen und einige B-Zellen (j). Wurden die SJL an d40 mit LPS immunisiert so zeigten die Tiere, die einen neuen Schub erlitten, stark entzündliche, zellreiche Infiltrate (k: HE; l: anti-Mac-3, Makrophagen; n: anti-CD3, T-Zellen; o: anti-B220, B-Zellen) mit reichlich MRP-14-positiven Zellen (m), die eine kürzlich erfolgte Invasion von Entzündungszellen in die Läsionen (Tag 75 nach der Immunisierung) anzeigen. Es wurden repräsentative Rückenmarkquerschnitte für die Bilddarstellung ausgewählt. Alle Tiere hatten einen entsprechenden klinischen EAE-Index beim ersten Schub, was einen direkten Vergleich der pathologischen Läsionen erlaubt. Ursprüngliche Vergrößerung a, b, d-g, l-l, n, o: 200x; c, h, m: 400x

5.3 LPS zeigt eine aktivierende Wirkung auf CD4-positive Zellen

Für die EAE konnte man eine entscheidende wenn nicht sogar essentielle Rolle der Th-Zellen für die EAE-Auslösung nachweisen. Aus diesem Grund stellte sich auch in dem hier betrachteten Modell die Frage, ob eine Aktivierung von Th-Zellen durch LPS zu beobachten sei. Die Th-Aktivierung war deshalb Gegenstand der ersten In-vitro-Versuche und wurde anhand von drei verschiedenen Parametern betrachtet.

5.3.1 Proliferation

Zur Messung der Proliferation von Th-Zellen wurden Milzzellen aus naiven und immunisierten SJL Mäusen (Tag 40-70) isoliert und mit 5 μ M CFDA-SE markiert. Dann wurden die Zellen mit SEB, MBP₈₅₋₉₉, LPS oder in Medium (KM) alleine in Kultur genommen, für 3 Tage im Brutschrank inkubiert und schließlich die proliferierenden CD4⁺-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Dieses Experiment wurde sowohl mit naiven als auch mit vorimmunisierten Mäusen mehr als drei Mal wiederholt und zeigte konsistente Ergebnisse.

In der Abbildung wurde eine typische durchflusszytometrische Proliferationsmessung für naive und für mit MBP-Peptid vorimmunisierte SJL gezeigt. In Abbildung 1 ist mit 6,12 % bei den naiven bzw. 9,53 % bei den vorimmunisierten SJL eine deutliche Proliferation der CD4⁺-Zellen auf LPS hin feststellbar. Die entsprechenden Mediumkontrollen liegen mit 1,93 % respektive 2,61 % proliferierenden CD4-Zellen weit unter den LPS-Werten. Auffällig ist, dass die Proliferationsantwort auf LPS bei den vorimmunisierten Mäusen im Bereich der mit MBP-Peptid stimulierten Zellen liegt.

Eine Proliferation von CD4⁺-Zellen durch LPS konnte somit sowohl für naive als auch für mit MBP-Peptid vorimmunisierte SJL nachgewiesen werden.

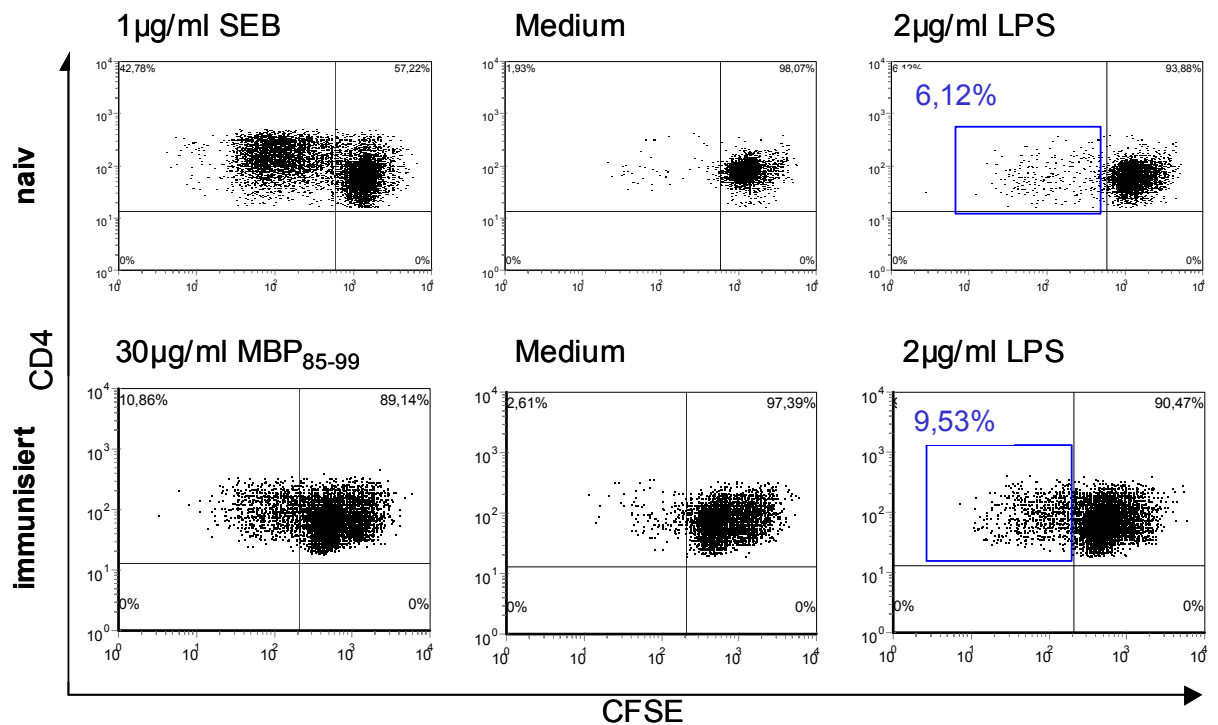


Abbildung 6: Proliferation der CD4⁺-Zellen nach 3 Tagen:

CFSE-behandelte Milzzellen von naiven und immunisierten SJL-Mäusen wurden in Medium alleine, mit MBP₈₅₋₉₉ oder mit LPS von *S. typhimurium* inkubiert. 72 h später wurden die Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen CD4 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die dargestellten Zellen sind lebende CD4⁺-Lymphozyten (FSC-SSC-Auswahl, Propidiumjodid-Ausschluss). Die Zahlen in der linken oberen Ecke geben jeweils die Prozentzahl der CD4⁺-Zellen an, die sich zumindest einmal geteilt haben. In Reihe A sind die Ergebnisse einer naiven SJL-Maus dargestellt, in Reihe B die Ergebnisse einer vorimmunisierten SJL Maus.

5.3.2 Aktivierungsmarker

Bei Aktivierung kommt es nicht nur zur Proliferation von Th-Zellen, sondern sie verändern auch die Expression von Molekülen auf der Zelloberfläche. Die untersuchten Moleküle waren einerseits CD69, das eine vermehrte Oberflächenexpression auf Aktivierung der Zelle hin erfährt, wohingegen CD62L (L-Selektin) vermindert exprimiert wird.

Es zeigt sich eine deutliche Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern auf Th-Zellen durch LPS im Vergleich zu den unbehandelten Zellen der Negativkontrolle.

Ergebnisse

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse dreier Einzelerperimente in einem Balkendiagramm gesammelt dargestellt.

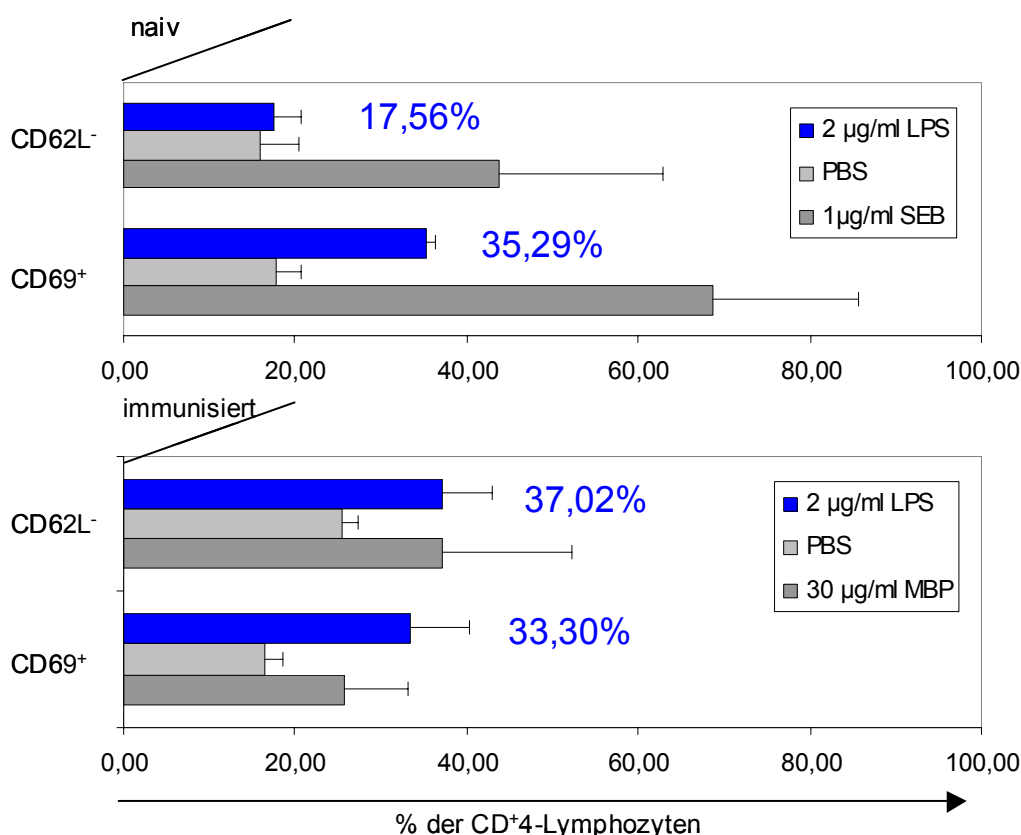


Abbildung 7: Aktivierungsmarker bei CD4⁺-Zellen nach 3 Tagen.

Milzzellen von naiven und immunisierten SJL-Mäusen wurden in Medium alleine, Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB), mit MBP₈₅₋₉₉ oder mit LPS von *S. typhimurium* inkubiert. An Tag 3 wurden die Oberflächenmoleküle CD4, CD69 und CD62L gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die dargestellten Prozentsätze beziehen sich auf den Anteil der den angegebenen Aktivierungsmarker tragenden (+) oder nicht tragenden (-) CD4⁺-Lymphozyten (FSC-SSC-Auswahl, Propidium-Jodid-Ausschluss). Gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei Einzelwerten innerhalb eines repräsentativen Experimentes.

Betrachtet man die Th-Zellen naiver SJL-Mäuse so wird CD69 nach drei Tagen LPS-Stimulation auf 35,29 % der Zellen exprimiert, wohingegen unstimulierte Zellen nur zu 17,73 % CD69 tragen. Ein identisches Bild findet man bei den mit MBP-Peptid vorimmunisierten SJL-Tieren, die auf 33,3 % der LPS-stimulierten Zellen bzw. 16,38 % der unstimulierten CD4⁺-Milzzellen CD69 tragen (Mittelwert von drei Tieren innerhalb eines Experiments nach drei Tagen Stimulation).

Das CD62L-Moleküle zeigte bei den naiven SJL keine Veränderung der Oberflächenexpression auf LPS-Stimulation hin. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den vorimmunisierten SJL ein deutlicher Anstieg der CD62L-negativen Th-Zellen, deren Anteil bei 37,02 % der Th-Zellen auf LPS-Stimulation gegenüber von 25,38 % auf PBS hin lag.

Bei beiden untersuchten Molekülen zeigte die Veränderung des Expressionsmusters die Aktivierung von Th-Zellen aus der Milz nach LPS-Stimulation an. Einzige Ausnahme ist der fehlende Verlust von CD62L bei den naiven SJL, den man jedoch bei den vorimmunisierten Tieren feststellen kann.

5.3.3 Zytokinproduktion

Th-Zellen wirken auf andere Zellen unter anderem durch die Produktion von Zytokinen. Da Genaues über die Zytokinproduktion von Th-Zellen auf LPS-Stimulus noch nicht bekannt war, wurde zunächst untersucht, ob und welche Zytokine spontan produziert werden.

Es wurden Milzzellen von naiven SJL-Mäusen isoliert und für 24 Stunden mit SEB, LPS oder PBS inkubiert. Für die letzten sechs Stunden wurde noch Brefeldin A hinzugefügt. Dann wurden die Zellen wie üblich für die durchflusszytometrische Messung fixiert und mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt.

Die Stimulation mit dem Superantigen SEB induzierte die Produktion der Zytokine γ -Interferon ($\text{IFN}\gamma$), Tumornekrosefaktor- α ($\text{TNF}\alpha$) und Interleukin-2 (IL-2), wohingegen von den mit LPS stimulierten Zellen nur $\text{IFN}\gamma$ produziert wurde. Nach 24h Inkubation war eine durch LPS ausgelöste deutliche Produktion von $\text{IFN}\gamma$ bei 0,43% der CD4-positiven Zellen zu beobachten. Die anderen untersuchten Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL-4, IL-5, IL-10, IL-2, GM-CSF und IL-6 wurden auf den LPS-Stimulus hin nicht spontan produziert.

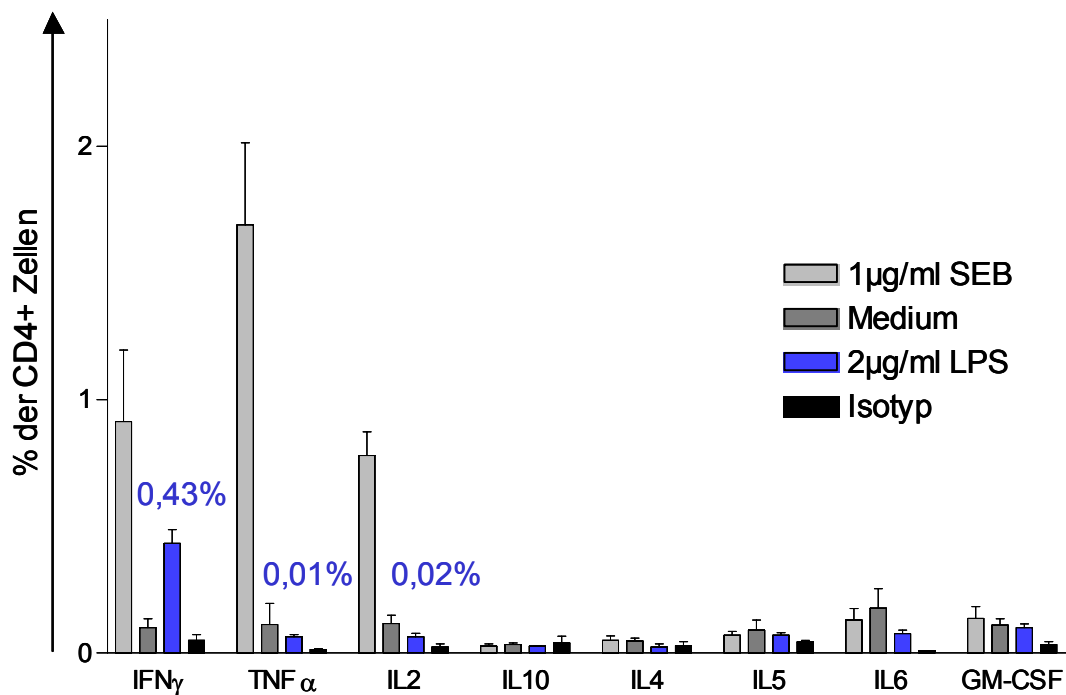


Abbildung 8: Zytokinproduzenten der CD4⁺-Zellen von naiven SJL-Milzzellen nach 24 h Inkubation

Für die Detektion der Zytokinproduktion unter den Th-Lymphozyten wurden Zellen von naiven SJL-Mäusen verwendet. Die Proben wurden für 24 Stunden mit Medium alleine, mit LPS von *S.typhimurium* oder in Anwesenheit von Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) inkubiert. Für die letzten 6 Stunden wurde noch Brefeldin A zugegeben. Der Mittelwert dreier Mäuse innerhalb eines Experiments ist als Balken gezeigt. Die Standardabweichung ist durch den Fehlerbalken gekennzeichnet. Die blauen Balken und die Zahlen geben die Werte für die LPS-Stimulation an. Die optimale Dauer und Dosis der Stimulation wurde in Vorexperimenten ermittelt. Eine beispielhafte Einzeldarstellung für die IFN γ - und TNF α -Produzenten findet sich als Dotplot-Diagramm in der ersten Zeile in Abb. 9.

Die 24h-Stimulation von SJL-Milzzellen mit LPS führte zu einer deutlichen spontanen IFN γ -Produktion der CD4⁺-Zellen, die für naive SJL im Bereich von 0,4 % der CD4⁺-Zellen lag.

5.3.4 Bei vorimmunisierten SJL findet man in-vitro mehr LPS-responsive Th- IFN γ -Produzenten

Antigen-erfahrene (Effektor/Gedächtnis-) Th-Zellen reagieren schneller bei erneutem Antigenkontakt und brauchen auch weniger kostimulatorische Signale als naive Th-

Ergebnisse

Zellen. Dass auch der LPS-Effekt größer ist, wenn solche Th-Gedächtnis-Zellen vorhanden sind, zeigt das folgende Experiment bei dem Milzzellen von naiven und mit MBP-Peptid immunisierten SJL Mäusen gewonnen wurden. Diese wurden jeweils mit LPS bis zum folgenden Tag stimuliert und für die letzten 6 h mit Brefeldin A inkubiert. Bei der anschließenden intrazellulären Färbung auf IFN γ zeigte sich ein deutlicher Unterschied an IFN γ -Produzenten je nach Immunisierungsstatus.

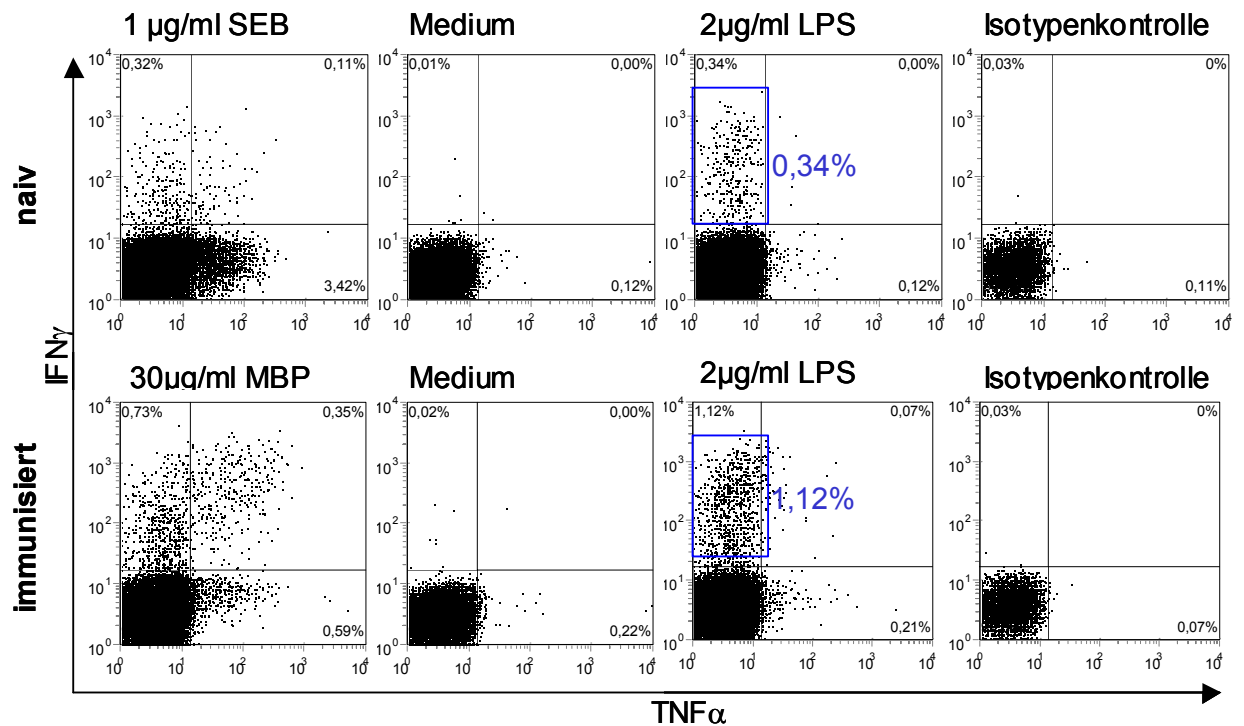


Abbildung 9: Zytokinproduktion naiver und vorimmunisierter SJL-Milzzellen nach 24 h Inkubation

Für die Detektion von Zytokinproduktion wurden Milzzellen von SJL-Mäusen, die entweder unimmunisiert (obere Reihe) oder 40 bis 60 Tage zuvor mit MBP₈₅₋₉₉/CFA s.c. (untere Reihe) immunisiert worden waren, verwendet. Die Proben wurden für 24 Stunden mit Medium alleine, mit LPS von *S.typhimurium* oder in Anwesenheit von SEB bzw. MBP₈₅₋₉₉ inkubiert. Für die letzten 6 Stunden wurde noch Brefeldin A zugegeben. In der oberen linken Ecke erkennt man jeweils den Anteil der reinen IFN γ -Produzenten an allen CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten.

Die LPS-stimulierten Milzzellen einer naiven SJL zeigen eine deutliche Population von 0,34 % IFN γ -Produzenten unter den Th-Zellen. Betrachtet man Milzzellen aus einer vorimmunisierten SJL, so liegt hier die Zahl der IFN γ -Produzenten auf LPS-Stimulus bei 1,19 % der CD3⁺/CD4⁺-positiven Lymphozyten.

Dieser Wert von 1,19 % liegt nicht weit entfernt von dem, der durch Antigen spezifische Stimulation unter den gleichen Bedingungen erreichbar ist und 1,08 % beträgt. Auffällig ist allerdings die größere Fraktion an TNF α /IFN γ -Doppelproduzenten (0,35 %) und TNF α -Einzelproduzenten (0,59 %) bei Antigen-spezifischer Stimulation, die im Falle von LPS beide nicht nachweisbar sind.

Die 24-h-Stimulation von SJL-Milzzellen mit LPS führte somit bei vorimmunisierten SJL zu einer wesentlich größeren Zahl von spontanen CD4⁺-IFN γ -Produzenten als bei den naiven SJL.

5.4 Der Mechanismus der LPS-induzierten Bystander-Aktivierung von Th-Zellen

5.4.1 LPS wirkt nicht direkt auf CD4⁺-Lymphozyten

Als nächstes stellte sich die Frage, wie genau LPS Th-Zellen aktivieren kann. Da bisher noch nicht eindeutig geklärt ist, ob murine T-Zellen funktionelle LPS-Rezeptoren (CD14, TLR4) exprimieren, wurden Th-Zellen aus vorimmunisierten SJL-Mäusen isoliert und mit LPS stimuliert.

Es wurden Milzzellen wie üblich gewonnen und mit dem MACS-Separationssystem (engl.: magnet-associated cell sorting; Magnet-assoziierte Zellsortierung) CD4⁺-Zellen angereichert, so dass sie eine Reinheit von > 97 % aufwiesen. Anschließend wurden die Zellen für einen Tag mit LPS stimuliert und die IFN γ - und TNF α -Produzenten unter den Th-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Da Th-Zellen ihr Antigen nur bei Präsentation durch MHC-II-tragende Zellen erkennen können, wurde in diesem Versuchsansatz als Positivkontrolle kein MBP-Peptid, sondern ein auf die Platte aufgebrachter Mix stimulierender α -m-CD3- und α -m-CD28-Antikörper verwendet. Es zeigte sich kein Effekt bei isolierten, mit LPS stimulierten Th-Zellen. Die Zahl der IFN γ -Produzenten unter den Th-Zellen lag bei 0,08 %, was im Bereich der PBS-Kontrolle mit 0,09 % liegt.

Um zu zeigen, dass die LPS-reaktiven Th-Zellen ihre Fähigkeit zur Zytokinproduktion beim Aufreinigen nicht verloren hatten, wurde eine Probe mit CD4 depletierten Zellen

(> 97 % CD4⁺) versetzt und ebenfalls mit LPS stimuliert, was zu einer IFN γ -Produktion bei 0,43 % der Th-Zellen führte.

Dieses Experiment wurde in der genannten Form mehr als dreimal wiederholt und zeigte konsistent, dass man bei isolierten Th-Zellen mit LPS keine IFN γ -Produktion auslösen konnte.

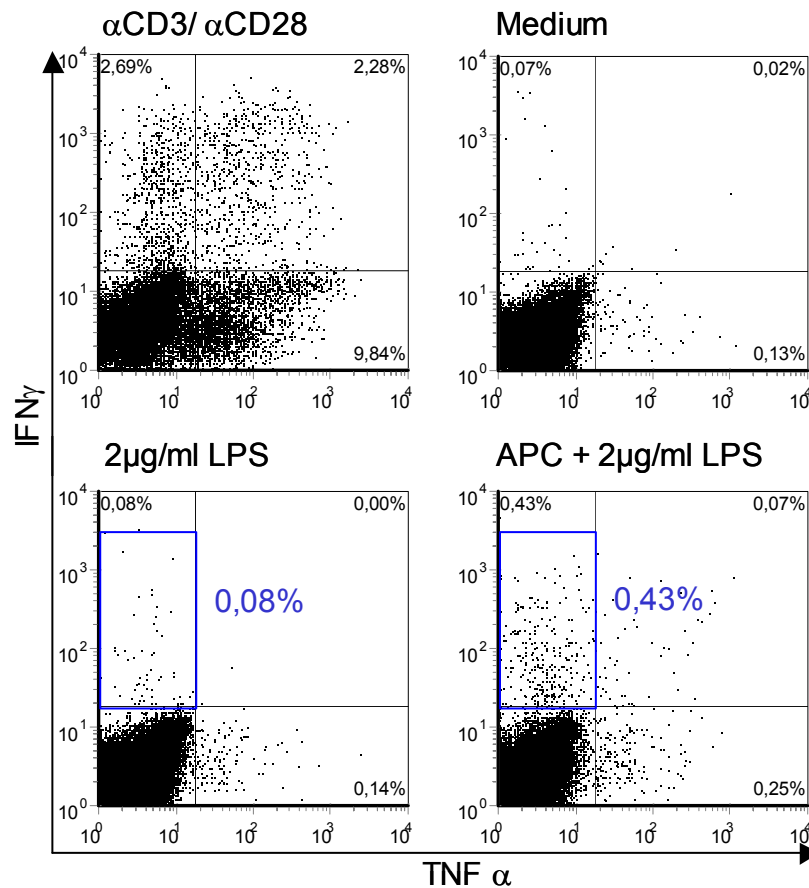


Abbildung 10: LPS-Wirkung auf angereicherte CD4⁺-Zellen

CD4⁺-Zellen wurden mit Hilfe von MACS aus Milzzellen von vorimmunsiierten SJL-Mäusen angereichert. Anschließend wurden die CD4⁺-Zellen (> 95 %) mit auf die Platte aufgebrachtem α CD3/ α CD28, Medium alleine oder LPS inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Anteil der IFN γ -Produzenten an den CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten bestimmt; als APC wurden CD4⁺-Milzzellen den entsprechenden Ansätzen wieder hinzugegeben; für die letzten 6 h wurde Brefeldin A hinzugefügt.

5.4.2 Th-Zellen aus Lymphknoten und dem ZNS zeigen schwächere Antworten auf LPS

Bei den bisher gezeigten Experimenten stammten die Zellen aus der Milz.

Um zu überprüfen, ob es einen Unterschied in der LPS-Antwort der Th-Zellen in anderen Organen gibt, wurden die tiefen zervikalen Lymphknoten und die aus dem Gehirn und Rückenmark isolierbaren Immunzellen von immunisierten SJL-Mäusen (d40-60) betrachtet.

Da sich die Zusammensetzung und die Art der dort vertretenen Immunzellen von der in der Milz unterscheidet, wurde im Teil A der folgenden Abbildung eine CD3-CD4-Färbung für jedes Organ beispielhaft dargestellt. Dieses Experiment zeigt eine unterschiedliche LPS-Responsivität der Th-Zellen in den verschiedenen Organen.

Man erkennt in Teil B, dass die Milz-Th-Zellen wie üblich auf LPS-Stimulus zu 1,02 % IFN γ produzieren. Im tiefen zervikalen Lymphknoten allerdings stellt man niedrigere Frequenzen auf LPS-Stimulus mit 0,13 % IFN γ -Produzenten unter den Th-Zellen fest, was im Bereich der PBS-Kontrolle liegt. Darüber hinaus sieht man, dass im tiefen zervikalen Lymphknoten mit dem Antigen keine IFN γ -Produktion (0,17 %) ausgelöst werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass im tiefen zervikalen Lymphknoten keine MBP₈₅₋₉₉-spezifischen Th-Zellen vorhanden sind und gleichzeitig keine LPS-induzierte IFN γ -Produktion auslösbar ist.

Im ZNS lässt sich trotz einer starken, durch Antigen auslösbarer Zytokinantwort, die bei 4,12 % gegenüber 2,61 % in der Milz liegt, nur eine schwache Produktion auf LPS von 0,56 % IFN γ gegenüber einer Negativkontrolle von 0,29 % feststellen. Gleichzeitig gibt es hier wesentlich weniger Nicht-T-Zellen, die ja für die Kostimulation verantwortlich gemacht werden.

Das bedeutet, dass man nur in Milzzellkulturen die LPS-induzierte Bystander-Aktivierung von Th-Zellen sicher beobachten konnte. Weder im tiefen zervikalen Lymphknoten noch im ZNS selbst konnte man eine LPS-reaktive IFN γ -Produktion auslösen.

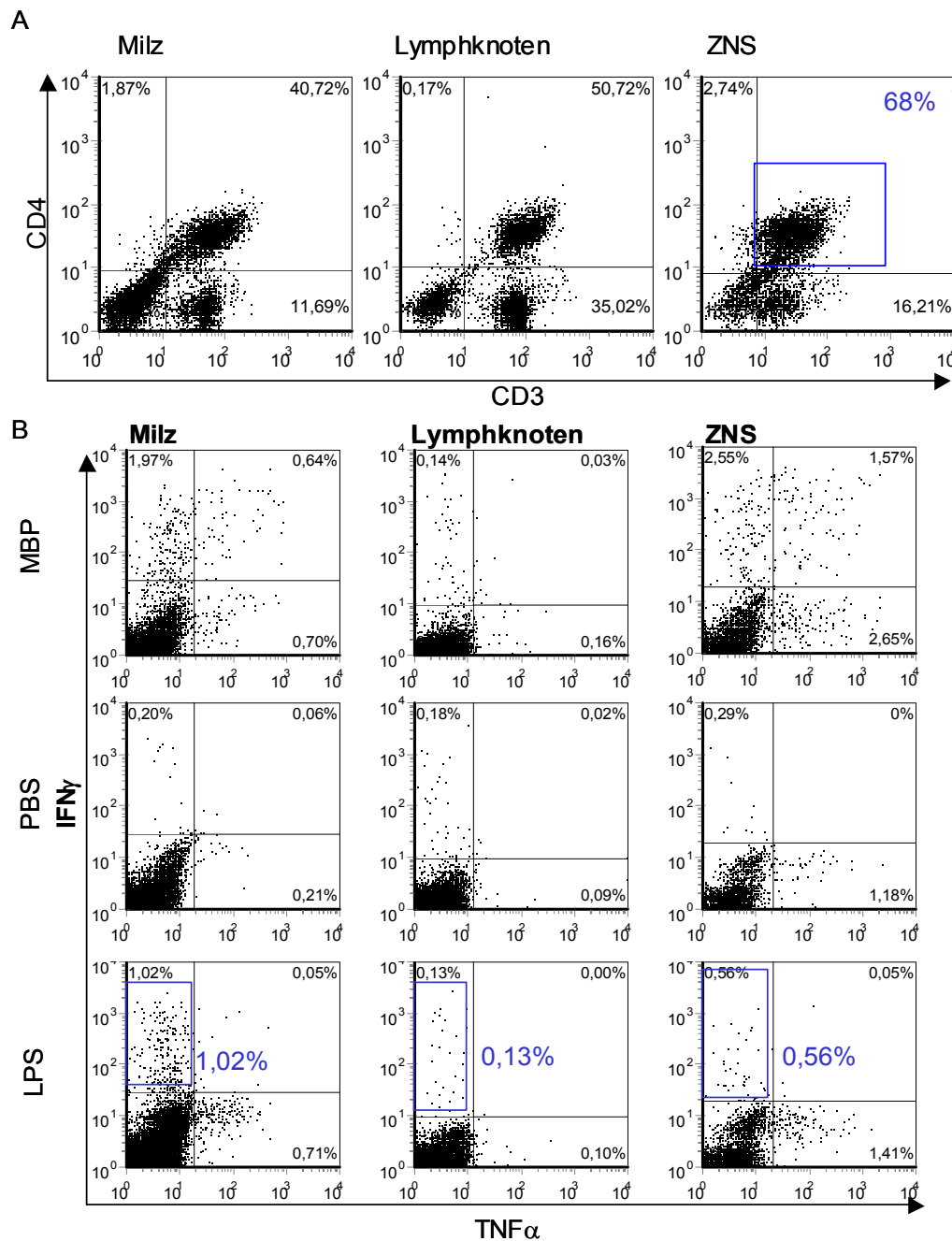


Abbildung 11: Zytokinproduktion durch LPS-Stimulus bei CD4⁺-Zellen aus Milz, tiefem zervikalem Lymphknoten und ZNS von vorimmunisierten SJL.

Im Teil A ist eine repräsentative CD3-CD4-Färbung aller Lymphozyten (FSC-SSC-Auswahl) der entsprechenden Proben gezeigt. Oben rechts erkennt man jeweils den prozentualen Anteil der CD3⁺/CD4⁺-Zellen in der Probe (nach 24 h Inkubation). Im Teil B wird die Anzahl der IFN γ - bzw. TNF α -Produzenten an den CD3⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten gezeigt. Oben links erkennt man jeweils die Zahl der reinen IFN γ -Produzenten nach 24 Stunden Inkubation mit LPS, MBP₈₅₋₉₉ oder Medium alleine. Für die letzten 6 Stunden wurde Brefeldin A zugegeben.

5.4.3 LPS-Effekte sind vom direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Th-Zellen und Nicht-Th-Zellen abhängig

Wie sich gezeigt hat läuft die LPS-induzierte Bystander-Aktivierung von Th-Zellen indirekt ab. Es muss also CD4⁻-Zellen geben, die direkt vom LPS beeinflusst werden und die Th-Zellen in einem zweiten Schritt aktivieren. Die Kommunikation zwischen Immunzellen geschieht über lösliche Mediatoren, Zell-Zell-Kontakt oder eine Kombination aus den beiden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten der Aktivierung unterscheiden zu können, wurden CD4⁺- und CD4⁻-Milzzellen von vorimmunisierten SJL-Mäusen mit Hilfe des Miltenyi-MACS-Zellsortiersystems getrennt. Bei einem Versuchsansatz blieben die Zellen räumlich getrennt, waren aber in der Lage lösliche Substanzen auszutauschen. Dazu wurden kleine Reaktionsgefäße verwendet, sogenannte Transwells, die nach unten mit einer Membran (0,4 µm Poren) abgeschlossen sind und dann in die herkömmlichen 24-Loch-Zellkulturplatten eingehängt wurden. In dem Transwell befanden sich jeweils 1x10⁶ sortierte CD4-Zellen in 200µl CM und in dem darunter liegenden Loch der 24-Lochplatte 2x 10⁶ APC in 1000µl Kompletmedium. Dann wurden LPS; MBP₈₅₋₉₉ bzw. PBS zugegeben und für einen Tag inkubiert. Für die letzten 6 h wurde noch Brefeldin A hinzugefügt und die Zellen wie üblich für eine intrazelluläre Zytokinfärbung auf TNFα und IFNγ aufgearbeitet. Eine Kontrolle mit den stimulierenden Antikörpern α-m-CD3 und α-m-CD28 zeigte, dass die Fähigkeit der CD4-Zellen zur Zytokinproduktion durch die Sortierung und die Kultivierung ohne Hilfszellen nicht verloren ging.

Die intrazelluläre Färbung von IFNγ in den CD4⁺-T-Zellen zeigt bei der durchflusszytometrischen Analyse, dass sowohl bei den unsortierten als auch bei den wieder kombinierten Zellen auf LPS hin eine IFNγ-Produktion bei 0,48 % respektive 0,46 % der Th-Zellen zu messen war. Hatten die Th-Zellen und die CD4⁻-Zellen allerdings nur die Möglichkeit lösliche Substanzen auszutauschen, so war die IFNγ-Produktion mit 0,07 % im Bereich der Mediumkontrolle mit (0,01 %) anzusiedeln. Somit reichen lösliche Mediatoren nicht aus, sondern es ist ein Zell-Zell-Kontakt zwischen akzessorischen Zellen und Th-Zellen für die LPS-induzierte Bystander-Aktivierung notwendig.

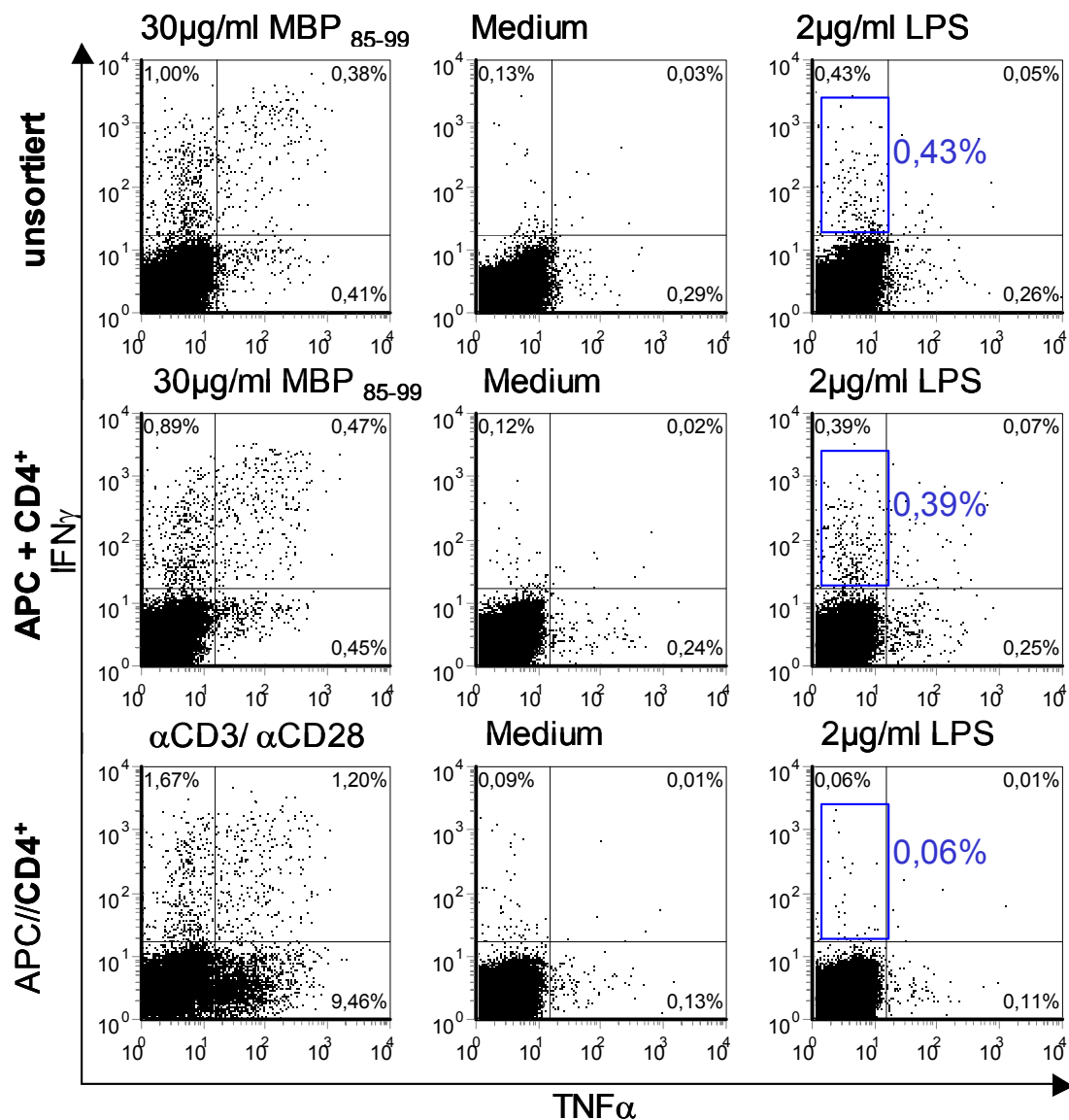


Abbildung 12: IFN γ -Produktion der CD4⁺-Lymphozyten ohne physischem Kontakt mit APC. CD4⁺- und CD4⁻-Zellen wurden mit Hilfe von MACS aus Milzzellen von vorimmunisierten SJL-Mäusen angereichert. In der oberen Reihe erkennt man die IFN γ -Produktion von unsortierten Milzzellen, in der zweiten Reihe die Zytokinproduktion von wieder vereinigten CD4⁺- und CD4⁻-Zellen. In der dritten Reihe ist das Ergebnis für CD4⁺- und CD4⁻-Zellen gezeigt, die nur lösliche Substanzen durch eine Membran (0,4 µm-Poren) austauschen konnten.

Weiterhin wurde zur Absicherung dieses Ergebnisses Überstand von LPS-stimulierten Milzzellen einer immunisierten SJL an Tag 1 und 3 gewonnen. Dann wurden Milzzellen von vorimmunisierten SJL-Mäusen gewonnen und mit dem MACS-System CD4-positive Zellen angereichert (> 95 % Reinheit).

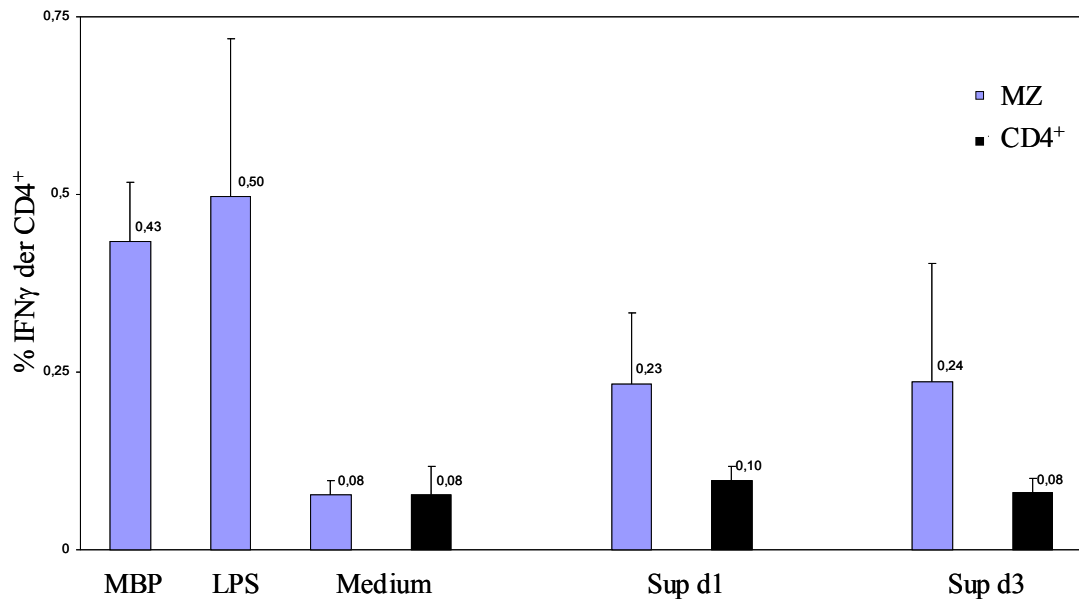


Abbildung 13: Dargestellt ist die Zahl der IFN γ -Produzenten unter den CD3⁺/CD4⁺-Zellen.

Die blauen Balken stellen die Zahl der IFN γ -positiven CD4⁺-Lymphozyten einer Milzzellkultur nach 24 h Inkubation dar, die schwarzen Balken zeigen die Ergebnisse für aus Milzzellen isolierte CD4⁺-Lymphozyten. SUP d1 bedeutet, dass 50 % des Mediums aus LPS-Überstand von Milzzellen nach einem Tag LPS-Stimulation bestand, SUP d3 entsprechend 50 % des Mediums nach drei Tagen LPS-Stimulation.

Diese erhielten zu 50 % frisches Medium und zu 50 % von den gewonnenen Überständen. Die Kontrollen wurden mit 100 % frischem Medium und den entsprechenden Zusätzen kultiviert. Das Balkendiagramm fasst die Ergebnisse dreier Tiere innerhalb eines Experimentes zusammen. Die Zahl der IFN γ -Produzenten unter den CD3/CD4⁺-Zellen beträgt bei LPS-Stimulation in der unsortierten Milzzellkultur durchschnittlich 0,5 % und bei den Überständen 0,23 bzw. 0,24 %. Betrachtet man die nach CD4 sortierten CD3⁺/CD4⁺-Zellen so ist mit 0,08 % bzw 0,1 % die Zahl der IFN γ -Produzenten bei den Überständen gleich der der unstimulierten Proben (0,08 %).

Die löslichen Mediatoren, die bei LPS-Stimulation in den Überstand freigesetzt werden bzw. durch eine Membran zwischen Th-Zellen und APC ausgetauscht werden können, reichen also nicht aus, um eine IFN γ -Produktion bei Th-Zellen auszulösen.

5.4.4 LPS-Effekte sind auch bei T-Zell-Rezeptor-Blockade messbar

Da lösliche Faktoren nicht der entscheidende Faktor bei der LPS-induzierten Bystander-Aktivierung sind, stellte sich die Frage, ob die Aktivierung über den T-Zellrezeptor erfolgt.

Dabei machte man sich zu Nutze, dass die Signalübertragung des T-Zellrezeptors und die daraus resultierende Antigen-spezifische IFN γ -Produktion der Th-Zellen durch Ciclosporin-A (CsA) in vitro relativ spezifisch und fast vollständig unterdrückt werden kann. Dieser Effekt ist gebunden an eine Einschränkung des intrazellulären Ca²⁺-Signalwegs, der durch eine starke Inhibition des Enzyms Calcineurin vermittelt wird .

Es wurden Milzzellen von naiven und immunisierten SJL-Mäusen gewonnen und mit 50nM CsA für eine Stunde inkubiert. Die entsprechende Negativkontrolle wurde mit der Trägersubstanz (DMSO) in KM alleine kultiviert.

Danach wurden LPS bzw. MBP₈₅₋₉₉ oder PBS hinzugegeben und am folgenden Tag noch für 6 h Brefeldin A hinzugefügt. Die folgende intrazelluläre Färbung untersuchte die IFN γ -Produktion von CsA behandelten bzw. mit Trägermedium behandelten Milzzellen.

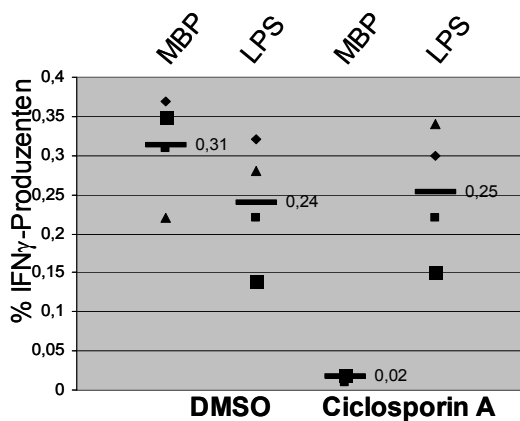
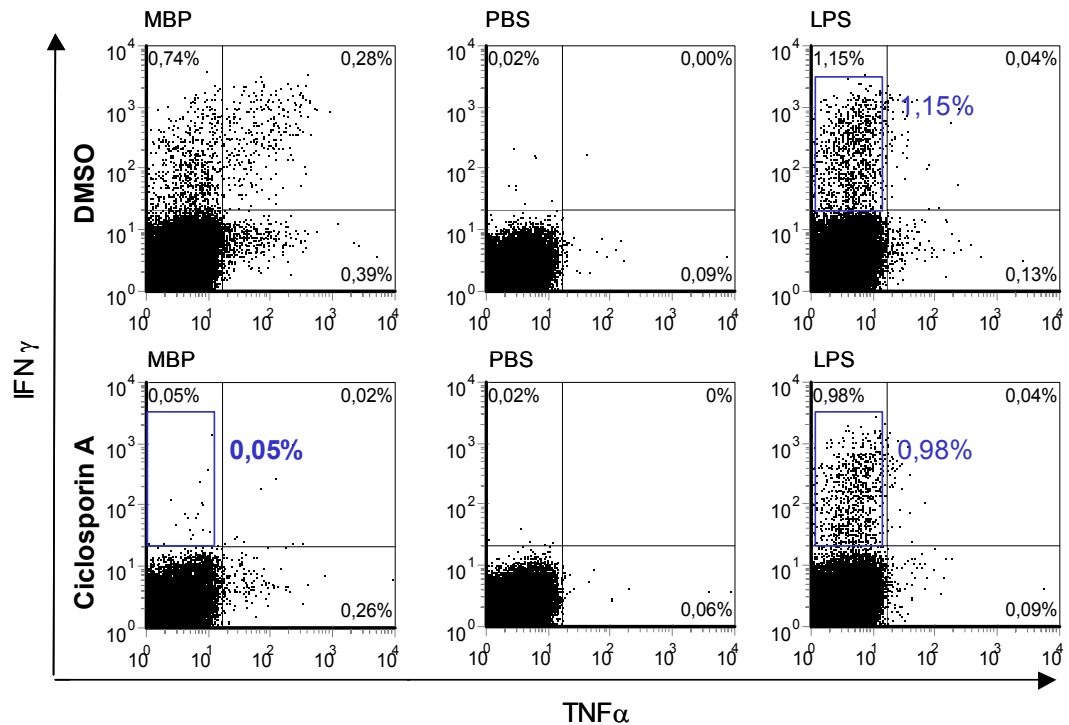
Für die naive SJL kam es bei der Inkubation mit SEB bzw. MBP₈₅₋₉₉ durch CsA zu einer fast kompletten Suppression der Zytokinproduktion, was für eine komplette Blockade des T-Zellrezeptors spricht. Im Gegensatz dazu hatte CsA keinen Einfluss auf die LPS-abhängige Zytokinproduktion.

Im Falle der immunisierten SJL-Tiere kam es auch zu einer kompletten Hemmung der IFN γ -Produktion auf das Antigen hin. Die LPS-induzierte IFN γ -Produktion wurde hingegen nur leicht supprimiert.

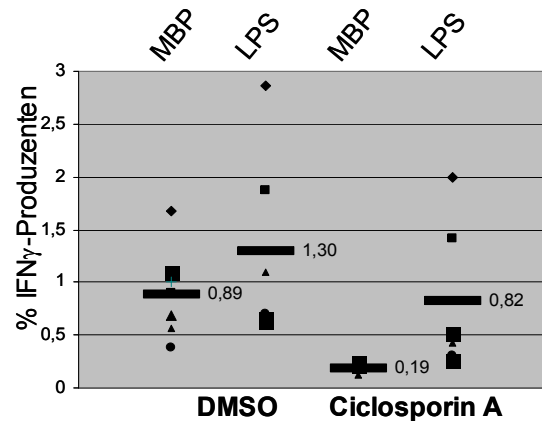
Die repräsentative FACS-Analyse der CD4⁺-IFN γ -Produzenten einer vorimmunisierten SJL in Teil A zeigt 0,98 % IFN γ -Produzenten in der CsA-behandelten Probe gegenüber 1,15 % in der ungeblockten Probe. Die zusammenfassende Darstellung aller Einzeltiere im Teil B bestätigt, dass es für die LPS-induzierte Zytokinproduktion im Vergleich zur Antigen-abhängigen nicht zu einer Verminderung der Zahl der Zytokinproduzenten kommt.

Somit läuft die LPS-induzierte Bystander-Aktivierung von Th-Zellen über einen anderen Signalweg als dem Calcineurin-vermittelten T-Zellrezeptorweg.

A vorimmunisiert mit MBP



B naiv



C immunisiert

Abbildung 14: IFN γ -Produktion der CD4⁺-Lymphozyten nach T-Zellrezeptor-Blockade

Im Teil A ist ein repräsentatives Einzelergebnis einer immunisierten SJL dargestellt. In der oberen Reihe erkennt man die Zahl der IFN γ -Produzenten unter den CD4⁺-Lymphozyten ohne Zugabe von CsA, in der unteren Reihe mit CsA. Im Teil B und C sind die Einzelergebnisse aus zwei Experimenten zusammengefaßt, wobei im Diagramm B naive und in C vorimmunisierte SJL gezeigt sind. Die ersten beiden Punktwolken zeigen den ungeblockten mit dem Trägermedium DMSO behandelten MBP und LPS-Wert für die IFN γ -Produktion der CD4⁺-Lymphozyten, die beiden letzten die mit CsA blockierten Proben. Die breiten Balken und die Zahl stellen jeweils den Mittelwert der entsprechenden Punktwolke dar.

5.4.5 Kostimulation spielt bei der LPS-induzierten Th-Zellaktivierung eine wichtige Rolle

Es konnte bisher gezeigt werden, dass zwar Zell-Zell-Kontakt für die LPS-induzierte Bystander-Aktivierung von Th-Zellen notwendig ist, dass diese aber nicht über den T-Zellrezeptor stattfindet. Daher stellte sich als nächstes die Frage, ob die LPS-induzierte Expression von kostimulatorischen Molekülen essentiell für die Bystander-Aktivierung ist. Da es eine große Anzahl von bekannten kostimulatorischen Molekülen gibt und die Existenz von vielen bisher noch nicht bekannten sehr wahrscheinlich ist, konnte nur ein Bruchteil der in Frage kommenden Kandidaten untersucht werden.

Zur Untersuchung des Einflusses der Kostimulation auf die Aktivierung von Th-Zellen durch LPS wurden blockierende Antikörper verwendet, die gegen bestimmte kostimulatorische Moleküle auf den Th-Zellen oder den APC gerichtet sind. Als essentiell erschienen dabei die Moleküle aus der B7-Familie (CD80, CD86 und CTLA-4 als Ligand), die auf LPS Stimulus verstärkt exprimiert werden. Weiterhin erschienen Moleküle interessant, die zur Stabilisierung des Th-APC-Kontaktes verantwortlich sind und auch aufgrund verschiedener aktivierender Eigenschaften zu den Aktivierungsmarkern gerechnet werden. Beispiele dafür sind CD18 (LFA1) und CD54 (ICAM1).

Dazu wurden Milzzellen aus vorimmunisierten SJL-Mäusen mit dem entsprechenden Antikörper für eine Stunde vorinkubiert und anschliessend mit LPS stimuliert und an Tag 1 für 6 h mit Brefeldin A versetzt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Zytokinproduktion durchflusszytometrisch bestimmt.

Um die Effekte graphisch veranschaulichen zu können, wurden die Zahlen der IFN γ -Produzenten unter den Th-Zellen im folgenden Diagramm auf den Wert der ungeblockten, mit LPS stimulierten Kontrolle normiert. Die Ergebnisse aus zwei Experimenten mit jeweils drei vorimmunisierten SJL wurden zusammengefasst und die berechneten Mittelwerte als breite Balken mit entsprechendem Zahlenwert dargestellt.

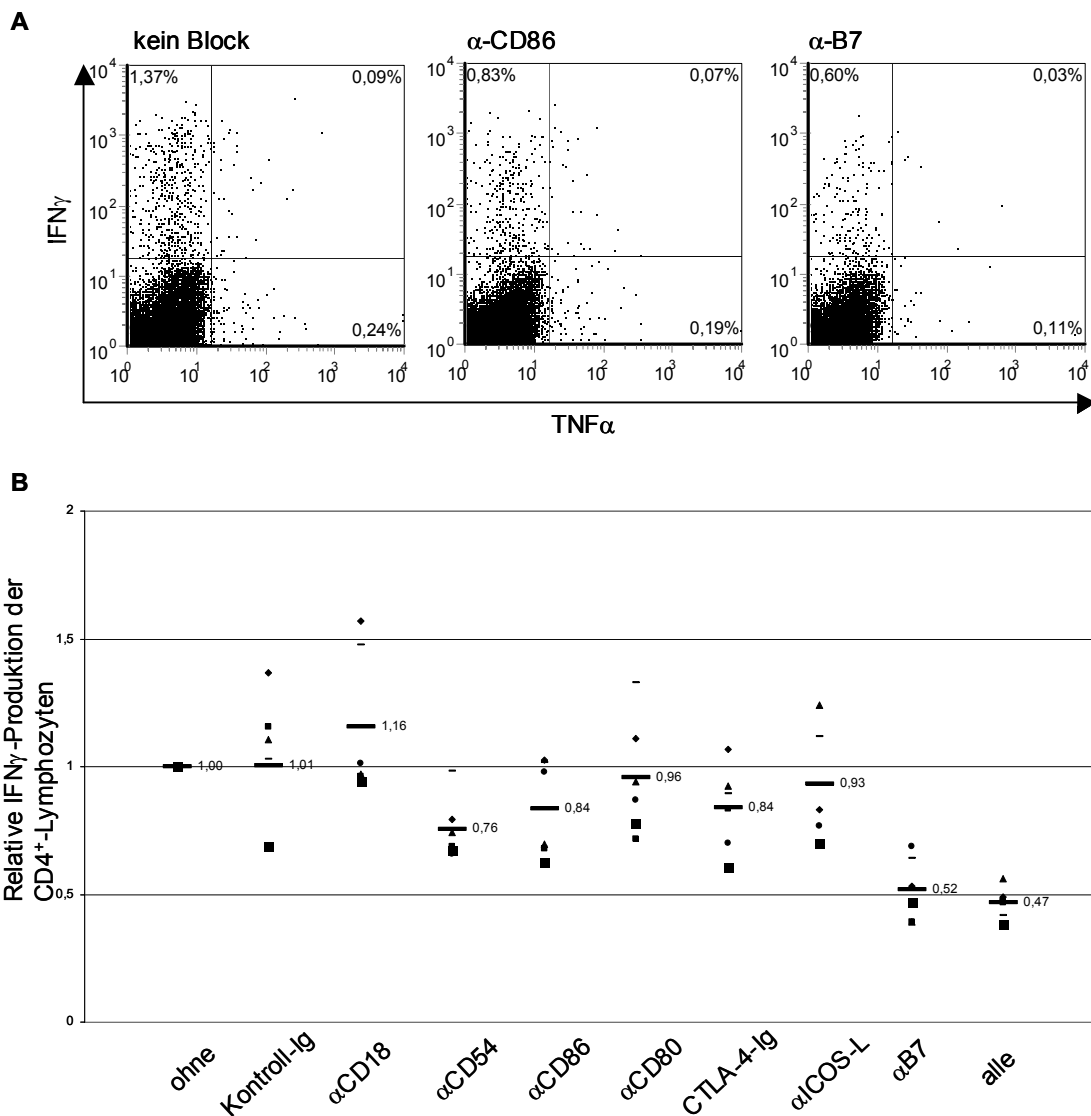


Abbildung 15: IFN γ -Produktion der CD4 $^{+}$ -Lymphozyten nach Blockade der Kostimulation Milzzellen von vorimmunisierten SJL wurden 24 h in der Anwesenheit von LPS mit oder ohne Antikörper gegen die angegebenen Oberflächenmoleküle oder CTLA-4-Ig inkubiert. Jeder Antikörper wurde in einer Konzentration von 20 μ g/ml eingesetzt. α -B7 bedeutet eine Kombination aus α -CD-80, α -CD86, α -ICOSL und CTLA-4-Ig. Die IFN γ -Produktion der CD4 $^{+}$ -Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Zytokinproduktion von CD4 $^{+}$ -Zellen mit LPS alleine oder nach Präinkubation mit dem angegebenen Antikörper. (B) IFN γ -Produktion von CD4 $^{+}$ -Zellen nach Kultur mit LPS alleine von 6 individuellen wurde 1 gesetzt und die anderen Werte als Bruchwert davon berechnet (Normalisierung). Die breiten Balken und die Zahl stellen jeweils den Mittelwert der entsprechenden Punktwolke dar.

Bei den Ansätzen, denen jeweils nur ein Antikörper hinzugefügt wurde, konnte man einen Trend ablesen, der für eine Suppression der Zytokinproduktion durch Blockade

von CD54, CD86, CD28 (durch CTLA-4-Ig) und ICOS spricht. Was eindrücklich gezeigt werden konnte ist, dass eine Kombination von verschiedenen blockierenden Antikörpern eine deutliche Beeinträchtigung der Zahl der IFN γ -Produzenten unter den CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen mit sich bringt.

So führte zum Beispiel die Kombination von α -CD80, α -CD86 und CTLA-4-Ig zu einer Suppression der IFN γ -Produzenten unter den Th-Zellen um 48 % und die Mischung aus allen Antikörpern zu einer Senkung der IFN γ -Produzenten um 53 %, was für einen deutlichen Einfluss verschiedener kostimulatorischer Moleküle spricht.

Die Blockierung der Kostimulation konnte also im Unterschied zur T-Zellrezeptorblockade zu einer deutlichen Einschränkung der LPS-induzierten IFN γ -Produktion der Th-Zellen führen.

6 Diskussion

Beim Menschen hat man bis dato keine Infektion finden können, die eine klare Verbindung zur Auslösung von Multipler Sklerose hat [Hemmer, 02; Kurtzke, 93]. Allerdings weiß man schon seit längerer Zeit durch epidemiologischen Studien, dass es einen Zusammenhang zwischen neuen Schüben bei an MS erkrankten Menschen und vorausgehenden Infektionen gibt [Andersen, 93; Panitch, 94; Sibley, 85]. Die immunologischen Wege, die Infektionen und Autoimmunität verbinden sind jedoch noch unbekannt.

Die vorgelegten Experimente zeigen zwei wichtige Ergebnisse. Einerseits kann man bei genetisch nicht veränderten Mäusen durch LPS EAE-Schübe auslösen. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Auslösung dieser Schübe abhängig ist von Gedächtnis-Th-Zellen, die indirekt durch kostimulatorische Moleküle antigenunabhängig aktiviert werden.

6.1 LPS-Wirkung bei naiven EAE-suszeptiblen Mäusen

Wie sich in den Versuchen mit den $T^+\alpha^-$ -Mäusen herausgestellt hat, ist bei transgenen monoklonalen Tieren eine Auslösung von EAE mit LPS möglich, auch wenn sie noch nie mit dem entsprechenden Antigen in Kontakt gekommen sind. Diese Mäuse unterscheiden sich in zwei entscheidenden Faktoren von normalen Tieren. Sie tragen einen eingeschleusten enzephalitogenen T-Zellrezeptor gegen ein MBP-Peptid und haben wegen der Deletion der α -Kette des T-Zellrezeptors kein normales heterogenes T-Zellrepertoire. Etwa 99% aller $CD4^+$ -T-Zellen exprimieren diesen enzephalitogenen T-Zellrezeptor.

Da es sich folglich um ein hoch artifizielles System handelt, war es nötig diese Ergebnisse daraufhin zu überprüfen, ob eine Relevanz auch im unbeeinflussten Immunsystem gegeben ist. Die konkrete Frage war also, ob es wirklich genügt eine erhöhte Zahl an naiven autoreaktiven Th-Zellen zu haben, um eine Autoaggression durch pathogen-assoziierte Immunstimuli auszulösen oder ob noch andere Faktoren eine Rolle spielen.

Dazu standen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung, die eine durch Inzucht bedingte EAE-Suszeptibilität aufweisen oder gezielt genetisch verändert wurden.

Die in der MS-Forschung häufig verwendete SJL-Maus gehört zu den Inzuchtstämmen mit einer genetischen Veranlagung für EAE. Die EAE-Suszeptibilität beruht hier unter anderem auf einer hohen Vorläuferfrequenz einer enzephalitogenen Th-Zellpopulation, die das Proteolipid-Protein-Peptid₁₃₉₋₁₅₁ (PLP) erkennt und bei 1/20000 liegt gegenüber der durchschnittlichen Frequenz von 1-2/1000000 pro Antigen [Anderson, 00].

Im Kontext dieser natürlichen erhöhten Zahl autoreaktiver Th-Zellen erkrankte keines von sechs Tieren durch die Injektion von LPS, was einher geht mit der Beobachtung, dass die SJL Maus sowohl in der konventionellen und als auch in der Pathogen-kontrollierten Haltung keine spontane EAE zeigt.

Auch bei den Stämmen PL/J und B10/PL, die unter anderem aufgrund einer erhöhten Zahl an MBP_{Ac1-11}-reaktiven Th-Zellen bei einem MHC H2A^u EAE-suszeptibel sind [Harrington, 98], löste LPS die Krankheit nicht aus.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei normalen nicht-transgenen Tiermodellen, die sich durch eine angeborene Suszeptibilität für EAE auszeichnen, keine EAE durch die Verabreichung von LPS auslösbar ist.

Um zu überprüfen, ob eine noch höher Zahl an autoreaktiven Zellen von entscheidender Bedeutung ist, wurde eine weitere transgene Maus betrachtet nämlich die DBA/DR2-Maus, die Träger eines humanen T-Zellrezeptors ist, der das MBP-Peptid₈₅₋₉₉ im Kontext von humanem CD4 und HLA-DR2 erkennt und bei Immunisierung mit dem Peptid zur Auslösung von EAE führt [Madsen, 99].

Auch hier konnte durch die Injektion von LPS keine EAE ausgelöst werden, was wiederum damit vereinbar ist, dass wir auch in der konventionellen Tierhaltung, die immer mit einer gewissen Keimbelastung einhergeht, im Gegensatz zu den T⁺α-Tieren [Goverman, 93; Lafaille, 94] keine spontane EAE beobachteten [Madsen, 99].

Die beiden transgenen EAE-Modelle unterscheiden sich vor allem dadurch, dass die T⁺α-Maus eine Deletion der endogenen α-Kette des T-Zellrezeptors hat, so dass sie kein endogenes T-Zellrepertoire hat, sondern zu 99% transgene T-Zellen. Dieser Unterschied legt die Annahme nahe, dass regulatorische Vorgänge innerhalb der endogenen

T-Zellpopulationen zu einer Kontrolle der potentiell autoreaktiven Zellen führen. Andererseits kann man auch davon ausgehen, dass selbst in pathogen-kontrollierte Haltebedingungen immer eine gewisse Keimbelastung vorhanden ist und ein Teil der transgenen Th-Zellen in den $T^+\alpha^-$ -Mäusen voraktiviert ist. Dieser sicherlich kleine Anteil an Th-Gedächtniszellen könnte dann in der DBA/DR2-Maus mit der geringeren absoluten Zahl an transgenen Zellen unter Umständen nicht ausreichend sein, um zur Auslösung von EAE durch LPS-Stimulus zu führen.

Aus diesen Ergebnissen kann man also schlussfolgern, dass LPS bei Vorhandensein eines endogenen Th-Zell-Repertoires sowohl bei einer natürlich als auch künstlich erhöhten Zahl an naiven, autoreaktiven Th-Zellen alleine nicht zur Auslösung von EAE führt.

Dieses Ergebnis überrascht nicht angesichts der Beobachtung, dass weder normale, suszeptible noch T-Zellrezeptor-transgene Tiere mit endogenem Th-Repertoire in der konventionellen Tierhaltung, wo sie ständig Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten ausgesetzt sind, EAE-Symptome entwickeln.

6.2 LPS-Immunisierung kann EAE-Schübe induzieren

LPS konnte in den untersuchten naiven Mäusen mit einer Suszeptibilität für EAE die Krankheit nicht auslösen. Ebenso konnte man auch beim Menschen noch keinen eindeutigen Beweis dafür finden, dass am Anfang der MS eine Infektion – ob spezifisch oder unspezifisch - als ursprünglicher Auslöser steht [Kurtzke, 93].

Die epidemiologischen Daten der MS-Forschung legen allerdings einen Zusammenhang zwischen Infektionen und einer Exazerbation der Erkrankung nahe. Das heißt bei schon Erkrankten findet man nach banalen unspezifischen Infektionen ein erhöhtes Risiko einen Schub zu erleiden. Gegenstand dieser Untersuchungen waren nicht gesunde Individuen der Normalbevölkerung, sondern MS-Patienten. Dabei beobachtete man gezielt den Einfluss von Infektionen und den zeitlichen Zusammenhang mit Schüben der MS [Buljevac, 02; Sibley, 85].

Daher liegt es nahe, auch im Tierversuch nicht naive Tiere zu betrachten, sondern solche die schon einmal einen Schub erlitten haben, damit man die Zusammenhänge aus den epidemiologischen Daten auch übertragen kann.

6.2.1 Immunstimuli und der Verlauf von EAE

In den Re-Induktionsexperimenten wird die Situation nachgestellt, die in der täglichen Klinik zu finden ist: Ein Patient wird mit MS diagnostiziert und erleidet in bestimmten Abständen Schübe dieser Krankheit, die laut epidemiologischer Datenlage zu einem bestimmten Anteil mit unspezifischen oft auch banalen Infektionen assoziiert sind.

In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass nach konventioneller MBP₈₅₋₉₉-Auslösung einer bei SJL-Mäusen meist monophasisch verlaufenden EAE durch eine Immunisierung im symptomfreien Zeitraum mit bakteriellen Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien (LPS) bei 46,4% der Tiere ein neuer Schub festzustellen war. Das relative Risiko nach Verabreichung von LPS einen Schub zu erleiden erreichte also bei einer Schubrate von 10% in der Kontrollgruppe einen Wert von 4,6. Die Verabreichung eines Immunstimulus in Form von LPS hat also pathologische Konsequenzen in Form einer Exazerbation der EAE-Symptomatik.

Dieses Phänomen lässt sich am ehesten mit einer erhöhten Zahl an Th-Gedächtniszellen erklären, die ZNS-Antigene erkennen können und im Unterschied zu naiven potentiell enzephalitogenen Th-Zellen wesentlich leichter zu reaktivieren sind. Warum es allerdings nicht bei allen Tieren zu einem neuen Schub kommt, bleibt zu erklären. Auch bei den epidemiologischen Daten gibt es diese Lücke, dass nur etwa zehn bis dreißig Prozent der registrierten Infektionen bei MS-Patienten von einem Schub gefolgt werden [Edwards, 98]. Ein Grund dafür liegt vielleicht in den vielfältigen regulatorischen Prozessen, die Autoimmunität verhindern können. Weiterhin wäre auch denkbar, dass eine zu geringe Zahl an autoreaktiven Th-Zellen durch Bystander-Aktivierung erreicht wurde und die Stärke der Aktivierung auch von der Art des Stimulus abhängig ist.

Ergänzend dazu stehen Arbeiten, die den schützenden Effekt von Immunstimuli auf den Verlauf von Immunerkrankungen und insbesondere der EAE haben.

Die Auswirkung chronischer Entzündungen waren dabei Gegenstand einer Arbeit, die die protektive Wirkung von Infektionen im Rahmen des EAE-Modells betrachtete [Birnbaum, 98]. Dazu wurden SJL-Mäuse mit PBS, IFA (Inkomplettes Freund's Adjuvanz) oder CFA immunisiert und damit eine chronische Entzündung ausgelöst. Nach

einer Latenzzeit von einem Monat untersuchte man dann die Auslösbarkeit bzw. den Schweregrad von EAE. Dabei konnte ein schützender Effekt einer chronischen Infektion durch IFA oder CFA in der konventionellen Tierhaltung beobachtet werden, wohingegen die Mäuse in der sauberen Tierhaltung durch CFA oder IFA Injektion nicht geschützt waren, sondern noch stärkere Symptome entwickelten. Die Autoren erklärten dieses Ergebnis mit der Schaffung eines Th2-Milieus durch die in der konventionellen Tierhaltung vorhandene mikrobielle Besiedlung.

Interessant ist dabei die Erkenntnis, dass Krankheiten bzw. mit Erregern assoziierte Immunstimulatoren unter Umständen konträre Einflüsse auf den Verlauf einer unabhängig davon existierenden Immunerkrankung haben könnten.

In unserem Fall verursachte die Stimulation eine Exazerbation der Erkrankung, während sie bei Birnbaum zu einer Protektion führte. Inwiefern man dabei von Th1- oder Th2-Milieus sprechen kann, bleibt zu klären. Es ist eher davon auszugehen, dass unterschiedliche pathogen-assoziierte Stimuli auch unterschiedliche Wirkungen haben. So wäre es denkbar, dass zum Beispiel ein aus Parasiten gewonnener Immunstimulus eine schützende Wirkung hat vor der Auslösung einer fehlgeleiteten Immunantwort.

Eine andere Arbeit betrachtet die Möglichkeit bereits erlangte Toleranzmechanismen durch Immunstimuli zu durchbrechen und EAE-Symptome auszulösen. Dazu induzierte man bei SJL-Mäusen durch eine PLP-Immunisierung in IFA eine Toleranz gegen das entsprechende Antigen und stellte fest, dass diese in-vitro durch aktivierende α CD40-Antikörper, CpGs (TLR-9-Aktivatoren) und durch IL-12 überwunden werden konnte. Durch Transfer der in-vitro voraktivierten Zellen konnten sie EAE in naiven Empfängern auslösen [Ichikawa, 02]. Auch hier wurden also die Th-Zellen mit ihrem Antigen konfrontiert und die Zahl der Th-Gedächtniszellen erhöht, auch wenn diese sich in einem anergen Stadium befanden. Anschließend wurde versucht mit verschiedenen Immunstimuli diese Gedächtniszellen wieder reaktiv zu machen.

Interessant an dieser Arbeit ist die Verwendung von TLR-Aktivatoren im Zusammenhang mit EAE, wobei die Publikation bei den In-vivo-Versuchen leider nicht auf die Verwendung eines TLR-Stimulus eingeht. In-vivo konnte die Toleranz mit einem α -CD40-Antikörper überwunden werden und bleibt somit den wirklichen Beweis von physiologischer TLR-Stimulation und EAE-Auslösung schuldig.

Die Ergebnisse stützen aber auch unsere Erkenntnisse, dass Kostimulation einen wichtigen Faktor bei der Induktion von Schüben ausmacht, untersuchen aber nur die Bedeutung eines einzigen Moleküls.

6.2.2 Abgrenzung der LPS-Schübe vom „Bystander-Schaden“

Der Begriff Bystander-Aktivierung wie er in dieser Arbeit bezüglich des ZNS verwendet wird, fordert eine periphere Antigen-unspezifische Aktivierung von potentiell enzephalitogenen Th-Zellen. Diese aktivierten Zellen wandern ins ZNS ein und erreichen durch wahrscheinlich lokale antigenspezifische Aktivierung das Effektorstadium, so dass als Folge eine Autoaggression im ZNS erfolgt [Flugel, 01]. Die gezeigten histologischen Abbildungen der durch LPS induzierten Schübe ähneln dabei dem Bild der klassischen EAE.

Ein begrifflich nahe stehender jedoch von der Art des Mechanismus anderer Prozess ist der Bystander-Schaden, der zwar von der Klinik her der klassischen EAE ähnelt, jedoch in der Histologie ein anderes Bild bietet [Haring, 02].

Der Bystander-Schaden ist bisher nur bei speziellen monoklonalen T-Zellrezeptor-transgenen Mausmodellen beobachtet worden. Die Auslösung hat als Ursprung eine Aktivierung durch Antigen in der Peripherie, die zur Bildung von T-Effektorzellen führt. Diese T-Effektorzellen sezernieren dann lösliche Mediatoren wie Zytokine oder erlangen zytotoxische Eigenschaften, um gezielt Zellen zu töten. Diese Effektorfunktionen dienen einerseits der Beseitigung des Antigens oder des ursprünglichen Erregers, andererseits kann es aber an empfindlichen Orten wie zum Beispiel dem ZNS unter bestimmten Umständen zur Schädigung nicht beteiligter Strukturen - also zum Kollateralschaden - kommen.

Die aktivierten Effektorzellen erkennen allerdings keine ZNS-Antigene und erreichen somit bei intakten Schranken das ZNS-Gewebe nicht, bzw. werden sie nicht lokal reaktiviert und können unter diesen Umständen keine Entzündung im ZNS auslösen. Nur bei vorgeschädigter Blut-Hirnschranke kann eine ausreichende Migration von Effektorzellen ins ZNS stattfinden und ein Bystander-Schaden entstehen.

Ein Beispiel ist die durch CD8⁺-T-Zellen vermittelte Bystander-Demyelinisierung, die bei RAG-defizienten Mäusen mit transgenem T-Zellrezeptor für ein Virus-Antigen beobachtet wurde. Immunisiert man die Tiere mit ihrem Antigen, was unter normalen Umständen nicht zu einer Schädigung des ZNS führt, da es nicht als Autoantigen funktioniert und co-infiziert die Mäuse gleichzeitig mit dem ZNS-tropen murinen Hepatitisvirus (MHV), so wird das ZNS für die aktivierten Zellen zugänglich. Die IFN γ -produzierenden CD8⁺-Zellen verursachen eine Zerstörung der Myelinscheide, die allerdings nicht spezifisch gegen Proteine der Myelinscheide gerichtet ist, sondern über die schädigende Wirkung der Entzündungsmediatoren funktioniert. Die Entzündungszellen kommen quasi über ein trojanisches Pferd in das ZNS, das für sie alleine nicht zugänglich wäre. Das klinische und pathologische Bild unterscheidet sich in diesem Fall von dem der klassischen EAE.[Haring, 02] Dieses Modell funktionierte nur, wenn gleichzeitig eine antigenspezifische Aktivierung mit einem (ZNS-irrelevanten) Antigen und die Infektion mit MHV, die den Zugang zum ZNS gewährte, zusammen kamen.

Dieses Prinzip der Infektion assoziiert mit der Aktivierung transgener T-Zellen findet man auch beim Insulin-abhängigen Diabetes [Horwitz, 98] und der durch Herpesviren induzierten Keratitis [Deshpande, 01]. In jedem dieser Beispiele war eine Aktivierung transgener T-Zellen simultan mit einer viralen Infektionen am Ort des Krankheitsgeschehens notwendig, um einen Bystander-Schaden zu verursachen.

Somit bezeichnet Bystander-Schädigung einen Prozess bei dem spezifisch aktivierte transgene T-Zellen durch eine gleichzeitig bestehende virale Infektion des Zielgewebes in dieses Gewebe vordringen können, wo sie letztendlich zu einem zusätzlichen unspezifischen Gewebeschaden führen.

Im Gegensatz dazu geschieht die Auslösung von Schüben mit LPS bei nicht-transgenen Tieren durch eine unabhängige T-Zellaktivierung ZNS-spezifischer Th-Zellen in der Peripherie, die lokal reaktiviert werden und zielgerichtet eine entzündliche Veränderung des Gewebes anrichten. Das histologische Bild entspricht bei den LPS-induzierten Schüben der klassischen Antigen-induzierten EAE, die wiederum dem histologischen Bild der MS ähnelt [Lassmann, 83].

6.3 LPS und die Bystander-Aktivierung von Th-Zellen

Bei naiven Mäusen konnte man selbst bei einer enorm hohen Zahl an potentiell autoreaktiven Th-Zellen nur bei den $T^+\alpha^-$ -Mäusen durch LPS eine EAE auslösen. Hingegen gelang die Induktion von EAE-Schüben bei SJL-Mäusen im symptomfreien Intervall recht einfach und mit 46% gegenüber 10% in der Kontrollgruppe in einer großen Zahl der Fälle. Warum diese Vorimmunisierung mit einem enzephalitogenen Antigen die Auslösbarkeit von Schüben möglich machte, verdeutlichen die in vitro Experimente.

6.3.1 LPS aktiviert Th-Zellen

Zur Beschreibung der Antigen unabhängigen Aktivierung von Immunzellen wurde in der Vergangenheit der Begriff der "Bystander-Aktivierung" geprägt und leider für verschiedene Phänomene benutzt. In dieser Arbeit bezeichnet er eine T-Zell-Aktivierung, die unabhängig vom T-Zellrezeptor durch aktivierte Antigen-präsentierende Zellen (APC) ausgelöst wird. Die beobachteten Parameter, die eine Aktivierung von Th-Zellen anzeigen, waren die vermehrte Expression von Aktivierungsmarkern, die Proliferation und die Zytokinproduktion von Th-Zellen.

In den In-vitro-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Milzzellen vorimmunisierter SJL-Mäuse mit LPS zu einer Proliferation von $CD4^+$ -Zellen führte, die beim zwei- bis dreifachen des Mediumwertes lag. Gleichzeitig war auch eine unspezifische Proliferation von Th-Zellen in der Negativkontrolle feststellbar, so dass zur glaubhaften Darstellung der Aktivierung der Th-Zellen durch LPS Oberflächenmoleküle betrachtet wurden, die bei Aktivierung auf Th-Zellen vermehrt exprimiert werden. Dabei konnte man eine deutliche Mehrexpression der betrachteten Oberflächenmoleküle feststellen, die für CD69 und CD62L vor allem bei den mit Autoantigen vorimmunisierten Mäusen im Bereich der antigenstimulierten Probe anzusiedeln waren. Jedoch sah man auch bei dieser Methode zur Bestimmung des Aktivierungszustands bei den PBS-Kontrollen einen gewissen Grad an Aktivierung, der vor allem bei den vorimmunisierten Tieren zu einer fehlenden Trennschärfe zwischen unspezifischem und LPS-Effekt führte.

Als Parameter mit der größten Trennschärfe erwies sich die Zytokinproduktion, die sowohl bei naiven als auch bei den vorimmunisierten Tieren deutlich messbar war und einen minimalen Hintergrund aufwies. Die LPS-stimulierten Th-Zellen produzierten vor

allem das proinflammatorischen Zytokin IFN γ , das auch von den für die Auslösung von EAE verantwortlich gemachten Zellen produziert wird [Ando, 89].

Während die Proliferation und die Expression von Aktivierungsmarkern in Kombination eine Aktivierung schon ausreichend belegten, so war doch die IFN γ -Produktion der entscheidende Schritt, der die in vitro Untersuchungen zu Mechanismen, die möglicherweise auch in vivo eine Rolle spielen könnten, ermöglichte.

6.3.2 LPS aktiviert zentrale, potentiell enzephalitogene Th-Gedächtniszellen

In durchweg allen Versuchen zur Aktivierung von CD4⁺-Zellen durch LPS fiel die konsistent deutlichere Antwort bei den immunisierten Tieren auf, die bei der Zytokinantwort etwa drei bis viermal höher war.

Die Immunisierung der Tiere lag dabei mindestens 40 Tage zurück und es waren keine neuen klinischen Symptome festzustellen, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit die Gedächtniszellen den höchsten Anteil an Antigen-spezifischen Zellen in den betreffenden Tieren ausgemacht haben und für die beobachtbaren Unterschiede verantwortlich gemacht werden können.

Die LPS-induzierte Aktivierung der enzephalitogenen Th-Zellen findet wahrscheinlich außerhalb des ZNS statt, da die Stimulation von aus dem Gehirn gewonnenen Immunzellen vorimmunisierter SJL im symptomfreien Intervall keine nennenswerte IFN γ -Produktion auslösen konnte. Dabei zeigte sich, dass eine Aktivierung dieser Zellen durch LPS trotz einer erhöhten Zahl an enzephalitogenen Zellen nur in geringem Maße möglich war. Dafür können mitunter zwei Faktoren verantwortlich sein.

Einerseits legt schon die Charakterisierung der gewonnenen Immunzellen eine starke Divergenz an Art und Zahl zwischen Milz und ZNS nahe. Die für die Bystander-Aktivierung wichtigen CD4⁺-Zellen sind im ZNS wesentlich weniger vertreten, was folglich die Art und Stärke der kostimulatorischen Möglichkeiten stark einschränkt.

Im humanen Liquor fand man an Immunzellen vor allem Th-Gedächtniszellen (CD25⁺, CD45RO) [Kivisakk, 02] und stellte auch fest, dass eine MHC-II-Expression im ZNS nur spärlich und nur auf reaktiven Mikrogliazellen und eingewanderten Makrophagen

zu finden ist [Bo, 94]. Eine lokale Population an dendritischen Zellen hat man bis heute nicht nachweisen können.

Dabei geht man heute davon aus, dass bei aktiver primärer Antigenimmunisierung eine ZNS-ferne Aktivierung der T-Zellen stattfindet und einige dieser Zellen im Rahmen der normalen Th-ZNS-Wanderung lokal - also im ZNS - reaktiviert werden und in die Peripherie zurückkehren. Dort aktivieren sie die Antigen-spezifischen Zellen und führen zu einer synchronisierten Relokalisation der enzephalitogenen Zellen ins ZNS. Besonders eindrücklich konnte diese Theorie durch die Aktivierung Ovalbumin erkennender transgener Th-Zellen bewiesen werden, die bis zur lokalen Reaktivierung und der synchronisierten Relokation ins ZNS identische Aktivierungsmuster erfahren wie transgene MBP-spezifische Th-Zellen [Flugel, 01].

Somit liegt auch für die LPS-EAE eine systemische Bystander-Aktivierung von zentralen Gedächtniszellen, zum Beispiel in der Milz nahe. Erkennen diese Th-Zellen ZNS-Antigene, so kann es nach Reaktivierung mit dem Antigen im ZNS zu einem neuen Schub kommen.

Das bedeutet, dass unspezifische systemische bzw. ZNS-ferne Infektionen oder Entzündungen als Auslöser eines Schubs in Frage kommen.

6.3.3 LPS aktiviert die Th-Zellen auf indirektem Wege

Die isolierten Th-Zellen vorimmunisierter SJL konnten nicht mit LPS unmittelbar aktiviert werden. Bei den Experimenten mit hoch-angereicherten $CD4^+$ -Zellen aus vorimmunisierten SJL konnte bei Stimulation mit LPS keine nennenswerte $IFN\gamma$ -Produktion nachgewiesen werden. Fügt man den sortierten Th-Zellen wieder $CD4^-$ -Zellen hinzu, so konnte man eine $IFN\gamma$ -Produktion wie bei unsortierten Milzzellen feststellen. Die gezeigten Ergebnisse sprechen also gegen eine direkte LPS-Wirkung auf Th-Effektorzellen und für eine essentielle Rolle der $CD4^-$ -Zellen.

Dennoch wurde an anderer Stelle eine direkte Aktivierung von $CD4^+$ -T-Zellen durch LPS diskutiert, da der entsprechende Rezeptor TLR4 mit RT-PCR auf mRNA-Niveau bei MACS-aufgereinigten $CD4^+CD25^+$ -Zellen nachgewiesen wurde [Caramalho, 03]. Ein Kritikpunkt bei diesem Vorgehen ist, dass bei der MACS-Aufreinigung von Zellen

immer nur eine Anreicherung der Zielpopulation zu erreichen ist. Die Aussagekraft einer Kombination von MACS-Sortierung mit einer sehr sensitiven Methode wie der RT-PCR ist somit aufgrund der eingeschränkten Reinheit der Zielpopulation kritisch zu sehen. Darüber hinaus führt eine Expression auf mRNA-Niveau nicht zwingend zur Expression eines funktionalen Proteins.

Die gezeigten Daten schließen allerdings zusätzliche indirekte Effekte durch LPS auf die T-Zellaktivierung nicht aus. So ist auch eine Inhibition von regulatorischen $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen denkbar, die, wie kürzlich beschrieben, durch von LPS induziertem IL-6 verursacht werden könnte [Pasare, 03].

Der Begriff der Bystander-Aktivierung postuliert weiterhin eine T-Zellrezeptor-unabhängige Th-Aktivierung. Ciclosporin hemmt wie Rapamycin und FK506 das Enzym Calcineurin, das eine wichtige Stellung im durch Calcium vermittelten Signalweg im Zytosol hat. Fällt dieser Signalweg aus, so kann eine Aktivierung der Th-Zellen über den T-Zellrezeptor nicht statt finden [Yang, 01]. Die Experimente haben gezeigt, dass Ciclosporin A die LPS-responsive $IFN\gamma$ -Produktion der Th-Zellen nicht vermindern konnte. Da Ciclosporin A gezielt die T-Zellrezeptor vermittelte Aktivierung vermindert, liegt daher der Schluss nahe, dass eine Antigenpräsentation zur Th-Aktivierung mit LPS nicht notwendig war. Sowohl bei den Transwell-Experimenten als auch bei den Versuchen mit den Überständen kam es durchweg zu einer geringeren Zahl an $CD4^+$ - $IFN\gamma$ -Produzenten sowohl unter den sortierten als auch unsortierten Zellen. Diese Divergenz zu den üblichen Zahlen von etwa 1% $CD4^+$ - $IFN\gamma$ -Produzenten kann mit der längeren Lagerung bei 4°C während der Zellaufarbeitung erklärt werden, die bei Zellsortierung ca. 5 Stunden und bei allen übrigen Versuchen nur maximal 2 Stunden betrug.

Eine T-Zellrezeptor-unabhängige Stimulation von T-Zellen wurde für $CD8^+$ -Zellen schon beschrieben. So konnte sowohl für dsRNA (doppelsträngiger Ribonukleinsäure), die den Toll-like Rezeptor (TLR)-3 bindet als auch für LPS, das den TLR-4 bindet, eine signifikante Proliferation von $CD8^+$ -T-Gedächtnis-/Effektorzellen($CD44^{hi}$) in-vivo nachgewiesen werden [Tough, 96]. In diesem Modell wurde allerdings keine Proliferation von $CD4^+$ -Zellen gemessen, was wahrscheinlich darauf zurück zu führen ist, dass eine Detektion von geringen Proliferationsraten mit Hilfe von BrdU-Aufnahme in vivo

mit einer Hintergrund-Proliferation von bis zu 30% auch extrem schwierig darzustellen ist [Tough, 97].

Die Vermittlung der Aktivierung konnte für dsRNA und LPS auf eine Induktion von Typ-I-Interferonen zurückgeführt werden, die wiederum die Produktion von Zytokinen wie IL-15 bewirkte. Dabei zeigte sich, dass auch die alleinige Injektion von IL-15 eine Proliferation der $CD8^+CD44^{hi}$ -Population bewirken konnte [Tough, 97; Zhang, 98].

Im Modell der Bystander-Aktivierung von $CD8^+$ -Zellen spielten also vor allem lösliche Mediatoren die entscheidende Rolle. Die Arbeiten im vorliegenden Th-Modell konzentrierten sich aber auf die $CD4^+$ -Zellen, da zelluläre Elemente der entscheidende Faktor für eine LPS-induzierte $IFN\gamma$ -Produktion bei Th-Zellen waren. Die Experimente zeigten, dass die indirekte Th-Aktivierung bei räumlicher Trennung von $CD4^+$ - und $CD4^+$ -Zellen bei erhaltenem Austausch löslicher Mediatoren nicht stattfand. In den Versuchen mit den Überständen bestätigte sich dann, dass der direkte, physische Kontakt zwischen LPS-reaktiven $CD4^+$ -Zellen und Th-Zellen die notwendige Bedingung für eine LPS-induzierte Bystander-Aktivierung war. Lösliche Faktoren wie sie in den produzierten Überständen vorkommen reichen in diesem Modell nicht aus um eine $IFN\gamma$ -Produktion bei Th-Zellen zu induzieren. Dieses Ergebnis steht im Konflikt mit einer anderen Arbeit, die zeigen konnte, dass Antigen-erfahrene, murine Th1-Zellen ohne gleichzeitige Gabe des Antigens durch eine Kombination von IL-12 und IL-18 zur $IFN\gamma$ -Produktion gebracht werden können [Yang, 01]. Inwieweit die verwendeten Zytokinkonzentrationen auf physiologischem Wege zum Beispiel durch LPS-Stimulus zu erreichen sind, bleibt unklar. Im SJL-Modell konnte durch LPS mit Überständen aus LPS-stimulierten Milzzellkulturen keine Bystander-Aktivierung in Form von $IFN\gamma$ -Produktion beobachtet werden.

6.3.4 Kostimulation als Erklärung für die Th-Zell-Aktivierung

In den vorgelegten Experimenten konnte trotz Blockade des T-Zellrezeptors - also des Signal-1-Weges - eine Aktivierung der Th-Zellen durch LPS erreicht werden. Gleichzeitig unterscheidet sich die hier beschriebene LPS-induzierte Bystander-Aktivierung in mehreren wichtigen Punkten von der in der Literatur zu findenden Zytokin-vermittelten Aktivierung von T-Zellen.

Der direkte Kontakt von CD4⁺-Zellen und CD4⁻-Zellen zwischen LPS-reaktiven CD4⁺-Zellen war notwendig und die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen der B7-Familie auf LPS-reaktiven APC und ihren Rezeptoren auf Th-Zellen war von entscheidender Bedeutung. Blockierte man kostimulatorische Moleküle aus der B7-Familie, so konnte man die IFN γ -Produktion der Th-Zellen vorimmunisierter SJL abschwächen.

In den letzten Jahren hat sich das Wissen über die Th-Zellen rapide vermehrt, so dass man weiß, dass die ursprüngliche Zwei-Signal-Aktivierung von T-Zellen über T-Zellrezeptor und IL2 den klassischen aber nicht den einzigen Weg zur Aktivierung von Th-Zellen darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass Signal 2 unter bestimmten Umständen in der Abwesenheit von Signal 1 eine T-Zellaktivierung in-vitro auslösen und zu pathogenen Konsequenzen in-vivo führen kann.

Dass gerade die B7-Familie eine wichtige Rolle bei der Auslösung bzw. Verhinderung von EAE hat ist schon lange bekannt. So zeigte Miller [Miller, 95], dass eine B7.1-Blockade das sogenannte „epitope spreading“, also das Wechseln der immundominanten Antigene bei den Folgeschüben, verhindern kann. Jedoch findet man die größte Bedeutung der B7-Kostimulation vor allem für naive Th-Zellen, die ihr Antigen zum ersten Mal treffen. Gerade für die Gedächtniszellen aber, die ja beim adulten, der Umwelt ausgesetzten Organismus einen großen Anteil der Lymphozyten ausmachen, konnte gezeigt werden, dass ein kostimulatorisches Signal zur nachhaltigen Aktivierung genügt. So gelang es nachzuweisen, dass Th-Zellen nach mehrmaliger Restimulation mit ihrem Antigen bei wesentlich geringeren Konzentrationen ihres Antigens zur Proliferation in der Lage waren. Darüber hinaus war eine geringere B7-Stimulation notwendig und auf CD40-Stimulation konnte gänzlich verzichtet werden [Racke, 95]. Umgekehrt konnte aber auch eine weitgehende Unabhängigkeit der T-Gedächtniszellen von der antigenspezifischen Aktivierung gezeigt werden, wenn sie durch kostimulatorische Moleküle aktiviert wurden. So konnte im Rahmen von Studien beobachtet werden, dass man mit „superagonistischen“ Antikörpern, die gegen CD28 [Luhder, 03; Tacke, 97] oder CD2 [Meuer, 84] gerichtet sind, eine rein durch Signal 2 vermittelte Aktivierung von Th-Zellen auslösen konnte.

Darüber hinaus hat sich die Kostimulatorenfamilie in den letzten Jahren durch ständige Neuzugänge zu einer wahren Großfamilie entwickelt. Die TLR4 vermittelte LPS-Stimulation bewirkt nicht nur die vermehrte Expression von Molekülen der B7-Familie [Carreno, 02; Sharpe, 02; Takeda, 03], sondern führt auch zu einer Mehrexpression von anderen kostimulatorischen Molekülen wie Mitgliedern der Tumornekrosefaktor-Rezeptor(TNF-R)-Familie und OX40. Die TNF-R-Familie hat eine besondere Bedeutung für die Kostimulation bei Gedächtnis-/Effektorzellen [Croft, 03] und für OX40 konnte gezeigt werden, dass enzephalitogene CD4⁺-Zellen dieses Molekül bei Aktivierung hoch regulieren und der Block mit OX40-Ig zu einer Abnahme des EAE-Schweregrades in-vivo führt [Weinberg, 99]. Die Bedeutung dieser beiden Familien gerade im Zusammenhang mit der EAE ist somit schon bekannt, jedoch weiß man noch wenig über die Mechanismen.

Dass die in den Versuchen beobachtete Verminderung der Zytokinexpression bei der Blockade einiger ausgewählter Kostimulatoren nicht komplett war, mag also auch an der Vielzahl der kostimulatorischen Molekülen liegen, die bei der Aktivierung von Th-Zellen beteiligt sind.

6.4 Der Einfluss von Infektionen und „Pathogen-assoziierten Pattern“ (PAMP) auf autoimmune Prozesse

Die Suche nach der Ursache für die Assoziation zwischen Infektionen und Autoimmunität beschränkte sich ursprünglich auf die Antigen-spezifische Immunantwort. Die populäre Hypothese der „Molekularen Mimikry“ beschrieb einen Mechanismus, der eine Sequenzähnlichkeit zwischen mikrobiellen und Selbstantigenen als Ursache für eine fehlgeleitete Immunantwort annahm [Bachmaier, 00; Gross, 98; Hemmer, 99; Oldstone, 87; Wucherpfennig, 95]. In der letzten Zeit häuften sich allerdings die Beweise, dass die Antigenerkennung durch die T-Zelle wesentlich degenerierter ist als ursprünglich angenommen und dass die Erkennung von Selbst- und mikrobiellen Antigenen durch einen T-Zellrezeptor ein häufiges und weit verbreitetes Ereignis darstellt [Benoist, 01; Grogan, 99; Hemmer, 98; Hemmer, 99; Kamradt, 01; Maier, 00].

Die vorgelegte Arbeit legt die Bystander-Aktivierung als Hypothese zu einer möglichen Verbindung zwischen Infektion und Autoimmunität nahe. Dabei geht man davon aus, dass potentiell autoreaktive Zellen zum normalen Repertoire des Immunsystems gehören [Martin, 90; Ota, 90; Pette, 90], wobei die Zahl und die Art dieser autoreaktiven Th-Zellen durch die genetische Ausstattung bestimmt ist, die zur Krankheitssuszeptibilität führt [Anderson, 00]. Das Überleben und die Expansion dieser naiven autoreaktiven Th-Zellen könnte entweder durch die Erkennung von Selbstantigenen oder durch mikrobielle Peptide [Ufret-Vincenty, 98] unterstützt werden. Die entscheidende Aktivierung geschieht dann möglicherweise unspezifisch durch Immunstimuli wie zum Beispiel Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien (LPS).

LPS hat im Immunsystem wichtige adjuvante Effekte, die man seit langer Zeit kennt und nutzt [DRESSER, 61; Reis e Sousa, 97; Skidmore, 76]. So konnte man zeigen, dass durch LPS stimulierte Makrophagen und B-Zellen mit Hilfe von Zytokinen bei T-Zellen einen Aktivierungs-induzierten Zelltod auslösten [Vella, 95]. Darüber hinaus kann die IFN- γ -Produktion von enzephalitogenen T-Zelllinien, die spezifisch für MBP sind, durch Kopräsentation von Antigen und LPS verstärkt werden [Segal, 97]. Dieser LPS-Effekt unterscheidet sich allerdings insofern von den hier beschriebenen Ergebnissen, als dass LPS alleine in der Abwesenheit von Antigen zur Proliferation und Zytokinproduktion von CD4⁺-Zellen führte.

Das Phänomen der Bystander-Aktivierung von autoreaktiven Th-Zellen ist in Einklang mit Daten aus der klinischen und experimentellen Forschung. So fand man ein spontanes Auftreten von EAE in Mäusen, die einen transgenen MBP-spezifischen T-Zellrezeptor tragen vor allem wenn sie in einer Umgebung gehalten wurden, in der man Mikroben und Viren nachweisen konnte [Lafaille, 94].

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen einige Studien, die ein erhöhtes Risiko für Schübe bei MS-Patienten mit alltäglichen Infektionen des Urogenital- und Verdauungstraktes in Verbindung bringen konnten [Andersen, 93; Buljevac, 02; Edwards, 98; Panitch, 94; Sibley, 85]. Gleichzeitig konnte trotz enormer Anstrengungen nie eine Assoziation zwischen einer bestimmten Infektion bzw. einem speziellen Pathogen und EAE-Induktion bei T-Zellrezeptor-transgenen Mäusen oder den MS-Exazerbationen bei Patienten bewiesen werden [Hemmer, 02; Kurtzke, 93].

Im Falle von MS, der Rheumatoiden Arthritis und dem Systemischen Lupus Erythematoses geht man heute davon aus, dass die autoreaktiven Th-Zellen durch noch wenig bekannte regulatorische Prozesse kontrolliert werden und dass bei deren Versagen eine Exazerbation möglich ist [Kamradt, 01]. Die Hypothese der Bystander-Aktivierung greift nun genau an dieser Stelle an. Antigen-unspezifische Stimuli, wie zum Beispiel LPS aktivieren unspezifisch Gedächtnis-Th-Zellen und darunter eben auch solche, die Autoantigene erkennen können. Ist die Aktivierung stark genug die regulatorischen Prozesse zu überwinden, so führt das zu einem Verlust des Gleichgewichts und letztlich zur Autoaggression.

Dieses Szenario geht Hand in Hand mit den klinischen Daten, die zeigen, dass nicht eine bestimmte Infektion mit bestimmten Autoimmunkrankheiten assoziiert ist. Exazerbationen von MS findet man bei vielen verschiedenen, oft banalen Infektionen. Dazu gehören solche mit gramnegativen Bakterien, bei denen LPS frei wird, aber auch solche mit grampositiven Bakterien und den verschiedensten Viren, die alle kein LPS besitzen [Andersen, 93; Buljevac, 02; Edwards, 98; Panitch, 94; Sibley, 85]. Doppelsträngige RNA von Viren und Lipoproteine grampositiver Bakterien können dabei das Immunsystem über den TLR3- bzw. TLR2-Rezeptor aktivieren. Es stellt sich also die Frage, inwiefern auch andere „Pathogen-assoziierte Pattern“ (PAMP), autoreaktive Th-Zellen via Bystander-Aktivierung aktivieren können.

6.5 Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Tiermodell auf den Menschen

In den vorgelegten Experimenten kam es nur bei 46 % der mit LPS immunisierten SJL zu einem zweiten EAE-Schub, was mit den Daten aus klinischen Studien gut zusammen passt. Dort kam es bei weniger als 10 % von registrierten Infektionen zu einem neuen MS-Schub im betrachteten Intervall. Eine Möglichkeit, dieses Phänomen zu erklären liegt darin, dass immunregulatorische Mechanismen klinisch offensichtliche Autoimmunität verhindern.

Andererseits könnte auch die Zahl an aktivierten autoreaktiven Th-Zellen einfach zu gering gewesen sein, um Schaden zu verursachen. Letztlich könnte dem Pathogen schlicht und einfach auch die Fähigkeit dazu fehlen, Bystander-Aktivierung auszulösen. Betrachtet man umgekehrt die Zahl der MS-Exazerbationen, so stellt man fest, dass nur ein Viertel der Fälle mit klinisch feststellbaren Infektionen [Buljevac, 02] assoziiert sind. Das mag darin begründet liegen, dass einige Infektionen klinisch inapparent ablaufen. Andererseits sind natürlich auch zusätzliche Mechanismen denkbar, die nicht durch Infektionen ausgelöst werden und MS-Schübe verursachen können.

Auch sollte man nicht aus den Augen verlieren, dass man immunpathologisch vier verschiedene Untergruppen der MS unterscheidet [Lucchinetti, 00], die auch divergierende immunpathologische Mechanismen als Grundlage haben können, was folglich zu einer unterschiedlichen Suszeptibilität für die durch Infektionen ausgelöste Immunpathologie führen kann.

Eine interessante Koinzidenz stellen Ergebnisse aus anderen Forschungsschwerpunkten dar. So zeigte sich im Rahmen der Atheroskleroseforschung für die Medikamentengruppe der Statine neben der Cholesterol-senkenden Wirkung auch ein entzündungshemmender Effekt. Diese zweite Wirkkomponente wurde speziell für die akute Mortalitätssenkung beim Myokardinfarkt verantwortlich gemacht. Auf der molekularbiologischen Ebene konnten dabei die Interaktion des Wirkstoffs mit Oberflächenmolekülen (ICAM1!) von Lymphozyten festgestellt werden [Frenette, 01]. Diese Daten sind im

Besonderen deshalb interessant, da sich zunehmend heraus kristallisiert, dass die Statine eine schubmindernde Wirkung bei der MS haben. Fügt man diese Ergebnisse zusammen, so besteht die Wahrscheinlichkeit, dass man schon ein Medikament gefunden hat, das den Einfluss von Infektionen und Entzündungen auf den Krankheitsverlauf der MS mindern kann [Bradbury, 02].

Interessant wäre daher die Wirkung von PAMP bei unbehandelten, gesunden und mit Statinen behandelten Patienten zu vergleichen, um die Frage zu beantworten, wie Statine genau funktionieren und ob sie womöglich einen Einfluss auf kostimulatorische Prozesse haben.

Die im EAE-Modell gezeigten Ergebnisse lassen sich gut mit den Daten vereinbaren, die bei epidemiologischen Untersuchungen zur Assoziation von MS und Infektionen gefunden wurden. Die Untersuchungen zur LPS-induzierten Bystander-Aktivierung autoreaktiver Th-Zellen zeigen eine wichtige Rolle kostimulatorischer Moleküle und die Bedeutung von autoreaktiven Th-Gedächtniszellen. Die Resultate dieser Arbeit eröffnen damit neue Fragestellungen, inwieweit man die Mechanismen aus diesem Mausmodell auch im humanen System wiederfindet und letztlich daraus therapeutischen Nutzen für MS-Erkrankte ziehen kann.

Abkürzungsverzeichnis

APC	engl.: antigen presenting cell
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	engl.: cluster of differtiation
CFA	engl.: complete Freund's adjuvance
CFSE	Carboxyfluoreszein-diazetatsuccinimidylester
CTLA-4	engl.:Cytotoxic T lymphocyte antigen 4
Cy5	Indodicarbocyanin 5
d	engl.: day
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalitis
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
FCS	engl.: fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	engl.: forward scatter
GM-CSF	engl.: granulocyte-monocyte colony-stimulating factor
h	engl.: hour
HLA	engl.: human leukocyte antigen
ICOS	engl.: inducible costimulator
IFA	engl: incomplete Freund's adjuvance
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.v.	Intravenous
KM	Kulturmedium
Ko	engl.: knockout
L	Ligand
LN	engl.: lymph node
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	engl.: Magnet associated cell sorting
MBP	engl.: myelin basic protein
MHC	engl.: major histocompatibility complex
mg	Milligramm
MS	Multiple Sklerose
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter

Abkürzungsverzeichnis

min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	engl.: messenger ribonucleic acid
nm	Nanometer
PAMP	engl.: pathogen associated molecular pattern
PBA	PBS, BSA, Azid
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PJ	Propidiumjodid
PLP	Proteolipid-Protein
RAG	engl.: recombinase activating gene
Rpm	engl.: rounds per minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SPF	engl.: specific pathogen free
SSC	engl.: side scatter
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	engl.: toll-like receptor
TZR	T-Zellrezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	engl.: unit
WM	Waschmedium

Literaturverzeichnis

Bücher:

Autor	Name des Buches	Auflage	Jahr	ISBN
Janeway, Charles; Travers, Paul et. al.	Immunologie	5. Auflage	2002	3-8274-1079-7
Alberts, Bruce; Bray, Dennis et. al.	Molekularbiologie der Zelle	3. Auflage	1995	3-527-30055-4

Zeitschriften:

- Andersen, O.; Lygner, P. E.; Bergstrom, T.; Andersson, M. und Vahlne, A. (1993): Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study, J.Neurol. (Band 240), Nr. 7, Seite 417-422. URL: PM:8410082
- Anderson, A. C.; Nicholson, L. B.; Legge, K. L.; Turchin, V.; Zaghouani, H. und Kuchroo, V. K. (2000): High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire, J.Exp.Med. (Band 191), Nr. 5, Seite 761-770. URL: PM:10704458
- Ando, D. G.; Clayton, J.; Kono, D.; Urban, J. L. und Sercarz, E. E. (1989): Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype, Cell Immunol. (Band 124), Nr. 1, Seite 132-143. URL: PM:2478300
- Antel, J. P.; Williams, K.; Blain, M.; Mcrea, E. und McLaurin, J. A. (1994): Oligodendrocyte Lysis by Cd4(+) T-Cells Independent of Tumor-Necrosis-Factor, Annals of Neurology (Band 35), Nr. 3, Seite 341-348. URL: ISI:A1994NA80500014
- Bach, J. F. (2002): The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases, N.Engl.J.Med. (Band 347), Nr. 12, Seite 911-920. URL: PM:12239261
- Bachmaier, K.; Le, J. und Penninger, J. M. (2000): "Catching heart disease": antigenic mimicry and bacterial infections, Nat.Med. (Band 6), Nr. 8, Seite 841-842. URL: PM:10932199
- Benoist, C. und Mathis, D. (2001): Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry?, Nat.Immunol. (Band 2), Nr. 9, Seite 797-801. URL: PM:11526389
- Birnbaum, G.; Kotilinek, L.; Miller, S. D.; Raine, C. S.; Gao, Y. L.; Lehmann, P. V. und Gupta, R. S. (1998): Heat shock proteins and experimental autoimmune encephalomyelitis. II:

- environmental infection and extra-neuraxial inflammation alter the course of chronic relapsing encephalomyelitis, *J.Neuroimmunol.* (Band 90), Nr. 2, Seite 149-161. URL: PM:9817443
- Bo, L.; Mork, S.; Kong, P. A.; Nyland, H.; Pardo, C. A. und Trapp, B. D. (1994): Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions, *J.Neuroimmunol.* (Band 51), Nr. 2, Seite 135-146. URL: PM:8182113
- Bradbury, J. (2002): Time right for statin trials in multiple sclerosis, *Lancet* (Band 360), Nr. 9344, Seite 1483. URL: PM:12433523
- Buljevac, D.; Flach, H. Z.; Hop, W. C.; Hijdra, D.; Laman, J. D.; Savelkoul, H. F.; Der Meche, F. G.; van Doorn, P. A. und Hintzen, R. Q. (2002): Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations, *Brain* (Band 125), Nr. Pt 5, Seite 952-960. URL: PM:11960885
- Caramalho, I.; Lopes-Carvalho, T.; Ostler, D.; Zelenay, S.; Haury, M. und Demengeot, J. (2003): Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide, *J.Exp.Med.* (Band 197), Nr. 4, Seite 403-411. URL: PM:12591899
- Carreno, B. M. und Collins, M. (2002): The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 20), Seite 29-53. URL: PM:11861596
- Compston, A. und Coles, A. (2002): Multiple sclerosis, *Lancet* (Band 359), Nr. 9313, Seite 1221-1231. URL: PM:11955556
- Coyle, A. J. und Gutierrez-Ramos, J. C. (2001): The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function, *Nat.Immunol.* (Band 2), Nr. 3, Seite 203-209. URL: PM:11224518
- Croft, M. (2003): Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity?, *Nat.Rev.Immunol.* (Band 3), Nr. 8, Seite 609-620. URL: PM:12974476
- Deshpande, S.; Zheng, M.; Lee, S.; Banerjee, K.; Gangappa, S.; Kumaraguru, U. und Rouse, B. T. (2001): Bystander activation involving T lymphocytes in herpetic stromal keratitis, *J.Immunol.* (Band 167), Nr. 5, Seite 2902-2910. URL: PM:11509638
- DRESSER, D. W. (1961): Effectiveness of lipid and lipidophilic substances as adjuvants, *Nature* (Band 191), Seite 1169-1171. URL: PM:13724354
- Edwards, S.; Zvartau, M.; Clarke, H.; Irving, W. und Blumhardt, L. D. (1998): Clinical relapses and disease activity on magnetic resonance imaging associated with viral upper respiratory tract infections in multiple sclerosis, *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* (Band 64), Nr. 6, Seite 736-741. URL: PM:9647301

-
- Flugel, A.; Berkowicz, T.; Ritter, T.; Labeur, M.; Jenne, D. E.; Li, Z.; Ellwart, J. W.; Willem, M.; Lassmann, H. und Wekerle, H. (2001): Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis, *Immunity*. (Band 14), Nr. 5, Seite 547-560. URL: PM:11371357
- Frenette, P. S. (2001): Locking a leukocyte integrin with statins, *N.Engl.J.Med.* (Band 345), Nr. 19, Seite 1419-1421. URL: PM:11794177
- Gautam, A. M.; Liblau, R.; Chelvanayagam, G.; Steinman, L. und Boston, T. (1998): A viral peptide with limited homology to a self peptide can induce clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J.Immunol.* (Band 161), Nr. 1, Seite 60-64. URL: PM:9647207
- Gerber, N.; Ambrosini, G. C.; Boni, A.; Ossola, A.; Wagenhauser, F. J.; Fehr, K. und von Felten, A. (1977): [Ankylosing spondylitis (Bechterew) and tissue antigen HLA-B 27. I. Diagnostic value of HLA-typing], *Z.Rheumatol.* (Band 36), Nr. 7-8, Seite 219-223. URL: PM:919797
- Goverman, J.; Woods, A.; Larson, L.; Weiner, L. P.; Hood, L. und Zaller, D. M. (1993): Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity, *Cell* (Band 72), Nr. 4, Seite 551-560. URL: PM:7679952
- Grogan, J. L.; Kramer, A.; Nogai, A.; Dong, L.; Ohde, M.; Schneider-Mergener, J. und Kamradt, T. (1999): Cross-reactivity of myelin basic protein-specific T cells with multiple microbial peptides: experimental autoimmune encephalomyelitis induction in TCR transgenic mice, *J.Immunol.* (Band 163), Nr. 7, Seite 3764-3770. URL: PM:10490973
- Gross, D. M.; Forsthuber, T.; Tary-Lehmann, M.; Etling, C.; Ito, K.; Nagy, Z. A.; Field, J. A.; Steere, A. C. und Huber, B. T. (1998): Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis, *Science* (Band 281), Nr. 5377, Seite 703-706. URL: PM:9685265
- Haring, J. S.; Pewe, L. L. und Perlman, S. (2002): Bystander CD8 T cell-mediated demyelination after viral infection of the central nervous system, *Journal of Immunology* (Band 169), Nr. 3, Seite 1550-1555. URL: ISI:000177025100051
- Harrington, C. J.; Paez, A.; Hunkapiller, T.; Mannikko, V.; Brabb, T.; Ahearn, M. E.; Beeson, C. und Goverman, J. (1998): Differential tolerance is induced in T cells recognizing distinct epitopes of myelin basic protein, *Immunity* (Band 8), Nr. 5, Seite 571-580. URL: ISI:000073885400005
- Hemmer, B.; Archelos, J. J. und Hartung, H. P. (2002): New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis, *Nat.Rev.Neurosci.* (Band 3), Nr. 4, Seite 291-301. URL: PM:11967559
- Hemmer, B.; Fleckenstein, B. T.; Vergelli, M.; Jung, G.; McFarland, H.; Martin, R. und

- Wiesmuller, K. H. (1997): Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone, *J.Exp.Med.* (Band 185), Nr. 9, Seite 1651-1659. URL: PM:9151902
- Hemmer, B.; Gran, B.; Zhao, Y.; Marques, A.; Pascal, J.; Tzou, A.; Kondo, T.; Cortese, I.; Bielekova, B.; Straus, S. E.; McFarland, H. F.; Houghten, R.; Simon, R.; Pinilla, C. und Martin, R. (1999): Identification of candidate T-cell epitopes and molecular mimics in chronic Lyme disease, *Nat.Med.* (Band 5), Nr. 12, Seite 1375-1382. URL: PM:10581079
- Hemmer, B.; Vergelli, M.; Gran, B.; Ling, N.; Conlon, P.; Pinilla, C.; Houghten, R.; McFarland, H. F. und Martin, R. (1998): Predictable TCR antigen recognition based on peptide scans leads to the identification of agonist ligands with no sequence homology, *J.Immunol.* (Band 160), Nr. 8, Seite 3631-3636. URL: PM:9558061
- Horwitz, M. S.; Bradley, L. M.; Harbertson, J.; Krahl, T.; Lee, J. und Sarvetnick, N. (1998): Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry, *Nat.Med.* (Band 4), Nr. 7, Seite 781-785. URL: PM:9662368
- Hugot, J. P.; Chamaillard, M.; Zouali, H.; Lesage, S.; Cezard, J. P.; Belaiche, J.; Almer, S.; Tysk, C.; O'Morain, C. A.; Gassull, M.; Binder, V.; Finkel, Y.; Cortot, A.; Modigliani, R.; Laurent-Puig, P.; Gower-Rousseau, C.; Macry, J.; Colombel, J. F.; Sahbatou, M. und Thomas, G. (2001): Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease, *Nature* (Band 411), Nr. 6837, Seite 599-603. URL: PM:11385576
- Ichikawa, H. T.; Williams, L. P. und Segal, B. M. (2002): Activation of APCs through CD40 or Toll-like receptor 9 overcomes tolerance and precipitates autoimmune disease, *J.Immunol.* (Band 169), Nr. 5, Seite 2781-2787. URL: PM:12193753
- Janeway, C. A., Jr. und Medzhitov, R. (2002): Innate immune recognition, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 20), Seite 197-216. URL: PM:11861602
- Kamradt, T. und Mitchison, N. A. (2001): Tolerance and autoimmunity, *N.Engl.J.Med.* (Band 344), Nr. 9, Seite 655-664. URL: PM:11228281
- Kivisakk, P.; Trebst, C.; Liu, Z.; Tucky, B. H.; Sorensen, T. L.; Rudick, R. A.; Mack, M. und Ransohoff, R. M. (2002): T-cells in the cerebrospinal fluid express a similar repertoire of inflammatory chemokine receptors in the absence or presence of CNS inflammation: implications for CNS trafficking, *Clin.Exp.Immunol.* (Band 129), Nr. 3, Seite 510-518. URL: PM:12197893
- Kuchroo, V. K.; Anderson, A. C.; Waldner, H.; Munder, M.; Bettelli, E. und Nicholson, L. B. (2002): T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 20), Seite 101-123. URL: PM:11861599
- Kurtzke, J. F. (1993): Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection,

- Clin.Microbiol.Rev. (Band 6), Nr. 4, Seite 382-427. URL: PM:8269393
- Lafaille, J. J.; Nagashima, K.; Katsuki, M. und Tonegawa, S. (1994): High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice, *Cell* (Band 78), Nr. 3, Seite 399-408. URL: PM:7520367
- Lassmann, H. (1983): Chronic Relapsing Experimental Allergic Encephalomyelitis - Its Value As An Experimental-Model for Multiple-Sclerosis, *Journal of Neurology* (Band 229), Nr. 4, Seite 207-220. URL: ISI:A1983QY05400001
- Lucchinetti, C.; Bruck, W.; Parisi, J.; Scheithauer, B.; Rodriguez, M. und Lassmann, H. (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination, *Annals of Neurology* (Band 47), Nr. 6, Seite 707-717. URL: ISI:000087386500003
- Luhder, F.; Huang, Y.; Dennehy, K. M.; Guntermann, C.; Muller, I.; Winkler, E.; Kerkau, T.; Ikemizu, S.; Davis, S. J.; Hanke, T. und Hunig, T. (2003): Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists, *J.Exp.Med.* (Band 197), Nr. 8, Seite 955-966. URL: PM:12707299
- Madsen, L. S.; Andersson, E. C.; Jansson, L.; Krogsgaard, M.; Andersen, C. B.; Engberg, J.; Strominger, J. L.; Svejgaard, A.; Hjorth, J. P.; Holmdahl, R.; Wucherpfennig, K. W. und Fugger, L. (1999): A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor, *Nature Genetics* (Band 23), Nr. 3, Seite 343-347. URL: ISI:000083792200026
- Maier, B.; Molinger, M.; Cope, A. P.; Fugger, L.; Schneider-Mergener, J.; Sonderstrup, G.; Kamradt, T. und Kramer, A. (2000): Multiple cross-reactive self-ligands for *Borrelia burgdorferi*-specific HLA-DR4-restricted T cells, *Eur.J.Immunol.* (Band 30), Nr. 2, Seite 448-457. URL: PM:10671200
- Martin, R.; Jaraquemada, D.; Flerlage, M.; Richert, J.; Whitaker, J.; Long, E. O.; McFarlin, D. E. und McFarland, H. F. (1990): Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals, *J.Immunol.* (Band 145), Nr. 2, Seite 540-548. URL: PM:1694881
- Meuer, S. C.; Hussey, R. E.; Fabbi, M.; Fox, D.; Acuto, O.; Fitzgerald, K. A.; Hodgdon, J. C.; Protentis, J. P.; Schlossman, S. F. und Reinherz, E. L. (1984): An alternative pathway of T-cell activation: a functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein, *Cell* (Band 36), Nr. 4, Seite 897-906. URL: PM:6231105
- Miller, S. D.; Vanderlugt, C. L.; Lenschow, D. J.; Pope, J. G.; Karandikar, N. J.; Dal Canto, M. C. und Bluestone, J. A. (1995): Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE, *Immunity.* (Band 3), Nr. 6, Seite 739-

745. URL: PM:8777719

Ogura, Y.; Bonen, D. K.; Inohara, N.; Nicolae, D. L.; Chen, F. F.; Ramos, R.; Britton, H.; Moran, T.; Karaliuskas, R.; Duerr, R. H.; Achkar, J. P.; Brant, S. R.; Bayless, T. M.; Kirschner, B. S.; Hanauer, S. B.; Nunez, G. und Cho, J. H. (2001): A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease, *Nature* (Band 411), Nr. 6837, Seite 603-606. URL: PM:11385577

Oldstone, M. B. (1987): Molecular mimicry and autoimmune disease, *Cell* (Band 50), Nr. 6, Seite 819-820. URL: PM:3621346

Ota, K.; Matsui, M.; Milford, E. L.; Mackin, G. A.; Weiner, H. L. und Hafler, D. A. (1990): T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis, *Nature* (Band 346), Nr. 6280, Seite 183-187. URL: PM:1694970

Panitch, H. S. (1994): Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis, *Ann.Neurol.* (Band 36 Suppl), Seite S25-S28. URL: PM:8017885

Pasare, C. und Medzhitov, R. (2003): Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells, *Science* (Band 299), Nr. 5609, Seite 1033-1036. URL: PM:12532024

Pette, M.; Fujita, K.; Kitze, B.; Whitaker, J. N.; Albert, E.; Kappos, L. und Wekerle, H. (1990): Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals, *Neurology* (Band 40), Nr. 11, Seite 1770-1776. URL: PM:1700336

Racke, M. K.; Scott, D. E.; Quigley, L.; Gray, G. S.; Abe, R.; June, C. H. und Perrin, P. J. (1995): Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis, *J.Clin.Invest* (Band 96), Nr. 5, Seite 2195-2203. URL: PM:7593605

Reis e Sousa; Hieny, S.; Scharon-Kersten, T.; Jankovic, D.; Charest, H.; Germain, R. N. und Sher, A. (1997): In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas, *J.Exp.Med.* (Band 186), Nr. 11, Seite 1819-1829. URL: PM:9382881

Segal, B. M.; Klinman, D. M. und Shevach, E. M. (1997): Microbial products induce autoimmune disease by an IL-12-dependent pathway, *J.Immunol.* (Band 158), Nr. 11, Seite 5087-5090. URL: PM:9164922

Sharpe, A. H. und Freeman, G. J. (2002): The B7-CD28 superfamily, *Nat.Rev.Immunol.* (Band 2), Nr. 2, Seite 116-126. URL: PM:11910893

Sibley, W. A.; Bamford, C. R. und Clark, K. (1985): Clinical viral infections and multiple sclerosis, *Lancet* (Band 1), Nr. 8441, Seite 1313-1315. URL: PM:2860501

Skidmore, B. J.; Chiller, J. M.; Weigle, W. O.; Riblet, R. und Watson, J. (1976): Immunologic

- properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS). III. Genetic linkage between the in vitro mitogenic and in vivo adjuvant properties of LPS, *J.Exp.Med.* (Band 143), Nr. 1, Seite 143-150. URL: PM:1244416
- Tacke, M.; Hanke, G.; Hanke, T. und Hunig, T. (1997): CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28, *Eur.J.Immunol.* (Band 27), Nr. 1, Seite 239-247. URL: PM:9022025
- Takeda, K.; Kaisho, T. und Akira, S. (2003): Toll-like receptors, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 21), Seite 335-376. URL: PM:12524386
- Tough, D. F.; Borrow, P. und Sprent, J. (1996): Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo, *Science* (Band 272), Nr. 5270, Seite 1947-1950. URL: PM:8658169
- Tough, D. F.; Sun, S. und Sprent, J. (1997): T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS), *J.Exp.Med.* (Band 185), Nr. 12, Seite 2089-2094. URL: PM:9182680
- Ufret-Vincenty, R. L.; Quigley, L.; Tresser, N.; Pak, S. H.; Gado, A.; Hausmann, S.; Wucherpfennig, K. W. und Brocke, S. (1998): In vivo survival of viral antigen-specific T cells that induce experimental autoimmune encephalomyelitis, *J.Exp.Med.* (Band 188), Nr. 9, Seite 1725-1738. URL: PM:9802984
- Vella, A. T.; McCormack, J. E.; Linsley, P. S.; Kappler, J. W. und Marrack, P. (1995): Lipopolysaccharide interferes with the induction of peripheral T cell death, *Immunity* (Band 2), Nr. 3, Seite 261-270. URL: PM:7535182
- Watts, T. H. und DeBenedette, M. A. (1999): T cell co-stimulatory molecules other than CD28, *Curr.Opin.Immunol.* (Band 11), Nr. 3, Seite 286-293. URL: PM:10375549
- Weinberg, A. D.; Wegmann, K. W.; Funatake, C. und Whitham, R. H. (1999): Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis, *J.Immunol.* (Band 162), Nr. 3, Seite 1818-1826. URL: PM:9973447
- Wucherpfennig, K. W. und Strominger, J. L. (1995): Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein, *Cell* (Band 80), Nr. 5, Seite 695-705. URL: PM:7534214
- Yang, J.; Zhu, H.; Murphy, T. L.; Ouyang, W. und Murphy, K. M. (2001): IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production, *Nat.Immunol.* (Band 2), Nr. 2, Seite 157-164. URL: PM:11175814
- Zamvil, S. S. und Steinman, L. (1990): The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 8), Seite 579-621. URL: PM:2188675

Literaturverzeichnis

- Zhang, X.; Sun, S.; Hwang, I.; Tough, D. F. und Sprent, J. (1998): Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15, *Immunity*. (Band 8), Nr. 5, Seite 591-599. URL: PM:9620680
- Zipp, F.; Weil, J. G. und Einhaupl, K. M. (1999): No increase in demyelinating diseases after hepatitis B vaccination, *Nat.Med.* (Band 5), Nr. 9, Seite 964-965. URL: PM:10470051

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater Thomas Kamradt bedanken, der mir durch kontinuierliche Anregungen, Hilfestellungen und nicht zuletzt durch die Überlassung des Themas die Fertigstellung dieser Doktorarbeit ermöglichte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Kerstin Bonhagen, Thordis Hohnstein, Wiebke Kaluza, Veronika Pampuch, David Schubert, Orissa Bender und Axel Nogai, die mich mit selbstverständlichem Einsatz in die verschiedenen Methoden eingewiesen haben und immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten.

Weiterhin möchte ich dem Mäuseteam um Manuela Ohde und den Labmanagern Heidi Hecker-Kia, Heidi Schliemann und Tuula Geeske danken, die durch ihre zuverlässige Arbeit meine Experimente erst möglich machten.

Für enorme Hilfsbereitschaft, gute Stimmung im Labor und aufmunternde Worte danke ich allen „Kamradts“ und den Mitarbeitern im DRFZ.

Meinen Freunden möchte ich für die vielen aufmunternden Worte und für das enorme Verständnis danken, das sie mir in dieser Zeit entgegengebracht haben.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich auch an meine Eltern richten, die mich all die Jahre unterstützt haben und ohne deren finanzielle Hilfe diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Name: Volker Siffrin
Anschrift: Mittenwalder Str. 1, 10961 Berlin
E-mail: siffrinv@gmx.de
Geburtsdatum: 17.12.1976
Geburtsort: Kaiserslautern
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1983-1987 Grundschole Kohlhof in Neunkirchen/Saar
1987-1996 Gymnasium am Steinwald Neunkirchen
Abitur 1996 mit der Note 1,0

Zivildienst:

1996-1997 Zivildienst in der Pflege im Krankenhaus Neunkirchen gGmbH

Studium:

1997-2000 Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
Physikum 09/99 mit der Note ‚sehr gut‘ (1,33)
Erstes Staatsexamen 08/00 mit der Note ‚sehr gut‘
2000-2001 Humanmedizin an der University of Aberdeen (GB) (4th year, phase III) - Auslandsstipendium der Studienstiftung
2001-2004 Humanmedizin an der FU Berlin/ Charité Universitätsmedizin Berlin
Drittes Staatsexamen 12/04 mit der Note ‚sehr gut‘
Abschluss im Studium der Humanmedizin mit der Gesamtnote (1,17)
Doktorarbeit am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin

Studienbegleitende Tätigkeiten:

1997-2004 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
1998-2000 Zweitstudium Anglistik/NDL (MA) an der Philipps-Universität Marburg
2000 Amerikanisches Staatsexamen (USMLE Step One)

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Es wurden keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad.

Mir ist die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung bekannt.

Berlin, den 16. September 2004

Volker Siffrin